

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Seleccção e caracterização de leveduras ‘starter’
a partir de populações autóctones de mosto**

Daniel Ribeiro da Silva McGuire

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Seleccção e caracterização de leveduras ‘starter’
a partir de populações autóctones de mosto**

Daniel Ribeiro da Silva McGuire

Dissertação orientada por: Professor Doutor Rogério Tenreiro

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2010

Esta dissertação de mestrado integra-se no Projecto I.C.O.N.E.

Com um montante de investimento superior a 600 mil euros, o projecto I.C.O.N.E. (Integração Coerente e Optimização de Núcleos de Excelência - SI I&DT nº 4586) tem como objectivo introduzir melhorias ao nível da organização e gestão da empresa e estimular a sua presença no mercado internacional.

Foi financiado pelo QREN, no âmbito do Programa Operacional Factores de Competitividade, no montante de 143 mil euros, dos quais 92 mil euros são provenientes do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.



Agradecimentos

Um trabalho desta magnitude nunca se faz só. Por detrás de cada autor está uma maré de gente a apoiar, a confortar, a encorajar e, mais que tudo, a garantir que, por muito que nos apeteça atirar com computador pela janela fora, largar as coisas e ir tomar uns copos com amigos, continuamos a árdua tarefa de por em palavras o andámos a fazer durante um ano.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Sogrape Vinhos S.A. e à PROENOL - Indústria Biotecnológica, Lda. a oportunidade de poder realizar esta tese. Em especial, gostaria de agradecer Dr António Graça e ao Eng. Filipe Centeno todo o apoio, informação técnica e disponibilidade no esclarecimento das várias dúvidas que surgiram durante o decurso desta tese.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, o excelentíssimo professor Doutor Rogério Tenreiro. Agradeço todas as discussões, todas as conversas, todos os momentos sérios e os menos sérios. Agradeço a boa disposição, o à vontade e a capacidade de fazer deste laboratório um sítio onde vir trabalhar é um prazer. Acima de tudo, agradeço quando me faz PENSAR, mesmo quando custa. Um forte abraço para um excelente professor, chefe, colega e, se me atrevo a dizer, amigo. Obrigado!

Ao meu ex-chefe e colega de grupo Abdelhak (Abdou) Lemsaddek, agradeço o acolhimento que me deu desde o primeiro dia. Obrigado pelas conversas, pelas brincadeiras, pelo apoio e pela paciência. Obrigado por me teres ensinado ciência. Muito do que sei devo-o a ti e não me esquecerei... Abraços

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Teresa Semedo, Tania Tenreiro, Cátia Fidalgo, Sérgio, Bernardo, Tânia, Ana Sofia Conduto, Ricardo Dias, professora Lélia Chambel e professora Ana Reis obrigado por todos os pequenos momentos que tornam um longo dia de trabalho cansativo mais fácil.

Um abraço/beijinho (escolham) aos “sem filtro” Inês Cardoso, Daniela Pinto, Cheila Antunes e Zé “Ai Senhores!” Batista pelas tardes de loucura, pelas conversas, pelos risos e pela amizade.

À “patrulha da noite”, Lara Lino e Carmen Santos por todos os lanches, jantares, cafés, pausas na escrita, desanuviarem e longas longas noites. Obrigado por terem aturado os maus humores e me terem mantido são...

Agradeço às minhas “pupilas” Carolina Andrade e Sofia Gomes por fingirem que percebem o que digo quanto estou a pensar numa coisa e a fazer outra. Obrigado por aturarem as minhas divagações, bizarras explicações e estranha maneira de pensar. Coragem!

À Sandra Chaves mando um beijinho muito especial pelo encorajamento, pelo apoio, pela amizade e por tudo o que fazes. Pelas palmadas na cabeça e pelas festinhas no ego.

À professora Ana Tenreiro, agradeço a eterna disponibilidade e infinita paciência para tudo e mais alguma coisa. gentileza, preocupação, carinho, amizade e por todos os sorrisos, cantigas e danças.

Agradeço às minhas amigas Cristina “Kro” Barbosa e Joana Cruz por nunca me levarem a sério, por manterem a minha auto-estima no sítio certo (lá em baixo) e por todas as vezes que me fazem a vida negra. Adoro-vos (sim, é suposto ser lamechas).

Aos biros (você sabem quem são) grandes senhores da paródia e da diversão! Agradeço a paciência, a compreensão e o facto de vocês serem sem dúvida OS MAIORES!!!! Desculpem todas as tampas e todas as vezes que me cortei à última da hora. Abraços rudes...

À minha família TiLena, TiJão, Pipa, João, Jorge, Fil e Drake obrigado por todas as ajuda, o constante apoio e por estarem lá sempre. Obrigado pelas vezes que se fingiram interessados enquanto repetia pela centésima vez os detalhes do meu trabalho. Sei que posso contar com vocês para tudo.

À Marta (Gorgeous)... Pelo apoio, pelo encorajamento, pelas palavras doces nos momentos certos e pelas duras quando é preciso. Obrigado por nunca desistires de mim, por me motivares a ser algo mais, a ser melhor. Obrigado pela infinita paciência (mesmo quando esgota) e por todas as pequenas coisas... Obrigado por seres como és e pelo que és para mim.

Finalmente dedico esta tese à minha mãe por tudo o que fez e o que faz por mim e pelos meus irmãos. Tudo o que sou de bom devo-o a ti. Love you*

RESUMO

O sabor do vinho, propriedade organoléptica, varia consoante o indivíduo, o ambiente em que se enquadra e a composição química do produto. Resultante de uma miríade de interações sensoriais, é influenciado por inúmeras variáveis como a casta da uva, as condições geográficas e ambientais do cultivo, o microbioma local e as práticas de fermentação e vinificação.

As leveduras, responsáveis pela fermentação alcoólica, ao converterem o mosto de uva em vinho exercem um papel predominante na determinação da constituição química deste. No entanto, o microbioma autóctone é altamente variável resultando, muitas vezes, em vinhos de qualidade incerta.

Uma cultura 'starter', preparação constituída por um número elevado de células de pelo menos um microrganismo, pode ser adicionada ao mosto, acelerando e dirigindo o seu processo fermentativo. Contudo, o uso de estirpes 'starter' comerciais pode mitigar as propriedades regionais características de alguns vinhos, originando uma procura crescente de estirpes autóctones, representativas das propriedades enológicas características de uma determinada região.

Neste trabalho estudou-se uma colecção de 768 leveduras, isoladas de mostos provenientes de quatro regiões DOC e fornecidos pela empresa Sogrape Vinhos S.A. em 2007, em busca de leveduras ecotípicas com potencial aplicação como 'starter'. A estratégia de selecção envolveu a aplicação de métodos moleculares de 'fingerprinting', para caracterização genómica e estudo da variabilidade da colecção, e microfermentações de mosto a diferentes condições. Durante o estudo, eliminaram-se sequencialmente as leveduras com desempenho menos promissor relativamente a uma estirpe 'starter' comercial usada como referência. Na parte final do trabalho procedeu-se ainda a uma análise comparativa de diferentes métodos moleculares de diferenciação, de forma a encontrar potenciais 'fingerprints' passíveis de utilização como marcadores moleculares para rastreio inequívoco dos isolados durante futuras fermentações industriais.

Palavras – chave: vinho; 'starter'; leveduras; 'fingerprinting' genómico; microvinificações

ABSTRACT

Wine flavor, as the culmination of a myriad of sensorial interactions carried out by subtle changes in the chemical composition of the wine, varies from individual to individual, depending on particular taste, local ambience and even mood. Nonetheless, the chemical composition of the wine is the cornerstone of the whole taste experience. As byproduct of alcoholic fermentation of must carried out by yeasts, the chemical composition of the wine is determined by many factors such as grape variety, geographical and viticultural conditions of grape cultivation and microbial ecology of grapes.

The natural yeast microbiota plays a dominant role in the composition of the final product affecting overall quality. Due to fluctuations in yeast population, spontaneous fermentations are unreliable, forcing the use of starter cultures to guarantee wine quality and consistence. Unfortunately, commercial starter strains sometimes mask the regional characteristics of a particular wine reducing uniqueness and value. As such, there is a growing demand for the use of autochthonous strains as starters in the production of wine from a particular region, guaranteeing the consistency and quality of the product while safeguarding the local characteristics.

In this study, 768 yeast isolates, belonging to Sogrape Vinhos S.A and originating from four DOC regions in Portugal, were studied for their potential use as starter cultures. The selection protocol consisted in the application of molecular fingerprinting methods for determination of variability and genetic characterization, followed by microfermentations in must at different conditions. Throughout the study, by comparison of performance with a commercial wine starter strain, the isolates with the worst scores were removed. The final part of the study encompassed a comparative analysis of molecular fingerprinting methods in search of molecular markers suitable for traceability of strains at the industrial level.

Key-words: wine; starter; yeasts; molecular fingerprinting; microfermentation

Índice

✓ Introdução Geral	1
✓ Fase I - Caracterização da colecção de leveduras por ‘fingerprinting’ molecular	5
1.1 Introdução	5
1.2 Material e Métodos	6
1.2.1 A colecção	6
1.2.2 Extracção de DNA genómico	7
1.2.3 ‘Primers’ e condições de amplificação	7
1.2.4 Análise dos perfis de ‘fingerprinting’ gerados por csM13	7
1.3 Resultados e Discussão	8
1.4 Conclusões	12
✓ Fase II - Selecção de leveduras por critérios clássicos	13
2.1 Introdução	13
2.1.1 Ensaio 1	13
2.1.2 Ensaio 2	14
2.1.3 Ensaio 3	14
2.1.4 Ensaio 4	15
2.1.5 Ensaio 5	16
2.2 Material e Métodos	16
2.2.1 Preparação dos isolados: reactivação e pré-inóculos	16
2.2.2 Preparação dos meios e condições de ensaio	16
.1 Ensaio 1 - 728 isolados	17
.2 Ensaio 2 - 342 isolados	17
.3 Ensaio 3 - 342 isolados	17
.4 Ensaio 4 - 342 isolados	18
.5 Ensaio 5 - 33 isolados	18
2.2.3 Determinação das taxas de crescimento	18
2.2.4 Identificação molecular dos isolados seleccionados no ensaio 1	19
2.2.5 Tratamento de dados	19

2.3 Resultados e Discussão	20
2.4 Conclusões	30
✓ Fase III - Métodos moleculares de diferenciação	31
3.1 Introdução	31
3.2 Material e métodos	32
3.2.1 'Primers' e condições de amplificação	32
3.2.2 Análise dos perfis	33
3.3 Resultados e discussão	33
3.4 Conclusões	38
✓ Conclusões gerais e perspectivas futuras	40
✓ Bibliografia	42
✓ Anexos	47

Introdução Geral

A evolução do vinho acompanha a da civilização há já milhares de anos, estando intimamente ligada à história da agricultura, cozinha e humanidade. Segundo o Instituto da Vinha e do Vinho, desde os tempos mais remotos, o vinho tem vindo a desempenhar um papel de relevo em quase todas as civilizações. Repleto de simbologia, impregnado de religiosidade e de misticismo, o vinho surge desde muito cedo na nossa literatura, tornando-se fonte de lendas e inspiração de mitos.

Pouco se sabe da história inicial do vinho sendo ainda desconhecido o local exacto onde foi feito pela primeira vez. Vestígios arqueológicos demonstram que a produção de vinho remonta a 6000 AC nas regiões do Cáucaso e Mesopotâmia. Referências a vinho foram encontradas no Egito e Fenícia datando de 5000 AC (Jackson 2000). Vestígios de domesticação das vinhas foram encontrados em ruínas datadas do início da idade do Bronze (cerca 3000 AC) nas regiões do Médio Oriente, Suméria e Egito (McGovern 2003;2009). Na Europa, os primeiros vestígios de produção de vinho remontam a escavações arqueológicas na Macedónia (6500 anos atrás; Viegas 2007).

O vinho era comum na Grécia e Roma antigas e muitas das principais regiões produtoras de vinhos actuais devem as suas origens aos Fenícios e Romanos (Estreicher 2006). A expansão do império romano levou a produção de vinho a todo o Mediterrâneo e em 500 AC o vinho estava a ser produzido na Sicília, Itália, França, Espanha, Portugal e Norte de África. Sob o domínio romano a vitivinicultura na Península Ibérica prosperou, os vinhos eram produzidos por todo o território tanto para consumo local como para exportação e as vinhas foram expandidas para o norte e interior.

No final do domínio romano a região do Douro estava já intimamente ligada à criação de vinhas e à produção de vinho. Com a fundação de Portugal o vinho tornou-se no produto mais exportado. Nos séculos XV e XVI, durante as descobertas Portuguesas, as caravelas carregavam sempre vinho.

Chegados ao século XVII, um sem número de registos de cariz geográfico e relatos de viagens, tanto de autores portugueses como de autores estrangeiros, traz à luz o contexto histórico das zonas vitivinícolas portuguesas. Com o crescente volume de exportações (reflexo da qualidade e prestígio dos vinhos), o vinho do Porto tornou-se, em 1756, tão famoso que, de forma a regular o comércio e a produção da região, e impedir contrafacções, foi criada a primeira região demarcada do mundo - a região produtora do vinho do Porto, a região Alto Douro.

Em 1907/1908, com o início do processo de regulamentação oficial de várias outras denominações de origem portuguesas, algumas regiões de produção de alguns vinhos já então famosos, como o caso dos vinhos da Madeira, Moscatel de Setúbal, Carcavelos, Dão, Colares e Vinho Verde, foram demarcadas (<http://www.cm-mirandela.pt/index.php?oid=3596>).

Com a adesão de Portugal à Comunidade Europeia surge uma nova perspectiva na economia portuguesa e, consequentemente, na viticultura. O conceito de Denominação de Origem Controlada foi harmonizado com a legislação comunitária, e foi criada a classificação de "Vinho Regional", para os vinhos de mesa com indicação geográfica, reforçando-se a política de qualidade dos vinhos portugueses.

Com objectivos de gestão das Denominações de Origem e dos Vinhos Regionais, de aplicação, vigilância e cumprimento da respectiva regulamentação, foram constituídas Comissões Vitivinícolas Regionais (associações interprofissionais regidas por estatutos próprios), que têm um papel fundamental na fiscalização e preservação da qualidade e do prestígio dos vinhos portugueses.

Actualmente estão reconhecidas e protegidas 32 Denominações de Origem Controlada e 8 Indicações Geográficas em Portugal (<http://www.cm-mirandela.pt/index.php?oid=3596>).

Hoje em dia o vinho é sinónimo de cultura e de um determinado estilo de vida complementando comida, entretenimento e artes. Desempenha um papel enorme na economia de inúmeras nações, estando estimada uma produção de mais de 26 mil milhões de litros de vinho anualmente. Os produtores modernos oferecem uma vasta variedade de vinhos durante todo o ano, independentemente da localização ou tempo. Uma acrescida competição a nível de mercado levou a uma elevada diversificação de produto e inovação nas técnicas ancestrais (Pretorius 2000).

O sabor do vinho é uma propriedade organoléptica que varia consoante o indivíduo, o ambiente em que se enquadra e a composição química do produto. O produto final é resultado de uma miríade de interações sensoriais influenciadas por inúmeras variáveis. Entre estas encontram-se a casta da uva, as condições geográficas e ambientais do cultivo, o microbioma da uva e as práticas de fermentação e vinificação (Fleet 2003).

Os microrganismos têm um papel predominante na determinação da constituição química do vinho. Afectam a qualidade da uva antes da vindima e, durante a fermentação, metabolizam os açúcares das uvas (glucose e frutose) e outros compostos formando etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos secundários que colectivamente contribuem para a subtilidade e individualidade do vinho (Fleet 2003). A conversão do mosto de uva em vinho transforma-se assim num processo complexo, mediado microbiologicamente e dependente da interacção de diferentes agentes como leveduras, bactérias e fungos filamentosos (Fleet 2001). Uma série de factores afectam a ecologia microbiana da produção do vinho. Dentre estes os principais são a composição química do mosto e os processos de fermentação deste. De todos os microrganismos envolvidos destacam-se as leveduras ao encarregarem-se da fermentação alcoólica, primeiro passo na conversão do mosto em vinho, e que consiste na conversão de glucose e frutose presentes no mosto em etanol, CO₂ e centenas de produtos secundários.

Originalmente, todo o vinho resultava de processos espontâneos originados pela microbiota natural presente nas uvas. A fermentação alcoólica era feita pelas inúmeras espécies de leveduras indígenas existentes à superfície das uvas e/ou adegas.

Os avanços da segunda metade do século XX mostraram claramente que a fermentação do mosto de uvas e a produção de vinhos não é tão simples como Pasteur, o fundador da enologia moderna, sugeriu há mais de um século. Na última década foram realizados progressos significativos no conhecimento da bioquímica e das interações de leveduras, bactérias e outros microrganismos no processo de vinificação.

O processo biológico da vinificação é assim o resultado de uma série de transformações bioquímicas, pela acção de várias enzimas de diferentes microrganismos, nomeadamente leveduras que são responsáveis pela fermentação alcoólica, principal fase do processo.

O microbioma autóctone (natural) é altamente variável. Isolamentos das leveduras existentes na superfície das uvas revelam uma predominância de espécies pertencentes aos géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Aureobasidium*, *Torulaspora* e *Rhodotorula* enquanto que *Saccharomyces cerevisiae*, a principal espécie usada nas fermentações alcoólicas está presente em baixas concentrações celulares (< 50 CFU/ml) (Fleet 2001; Fleet et al. 1984; Heard & Fleet 1985).

Uma série de factores entre eles o método de vindima, as condições de transporte (temperatura, distância, sulfitação) e as condições das uvas, afectam a predominância destas leveduras na superfície das uvas e consequentemente a sua presença/ausência no mosto. Sendo assim, a influência destas leveduras no aroma do vinho torna-se altamente variável resultando numa baixa reprodutibilidade (Fleet 2001). Para além disto podem ainda ocorrer fermentações interrompidas (não conversão total do açúcar em etanol), potenciando o aparecimento de microrganismos contaminantes.

Fermentações alcoólicas lentas ou incompletas são o calcanhar de Aquiles da indústria enológica. Fermentações incompletas são fermentações alcoólicas que terminam quando ainda existe uma concentração de açúcares residuais (glucose e frutose) acima de 4 g/l sendo que concentrações típicas para uma fermentação completa situam-se abaixo dos 2 g/l. Fermentações lentas são aquelas que demoram, em média, mais tempo a atingirem baixos valores residuais de açúcares. Uma fermentação de rotina requer entre 7 a 15 dias, dependendo da temperatura e do tipo de vinho. Uma fermentação lenta pode chegar a demorar meses. O consumo lento de açúcares pelas leveduras é geralmente um bom indicador de condições adversas no decurso da fermentação. Vinhos com elevados teores de açúcares residuais são altamente susceptíveis a deterioração microbiológica, impedindo o engarrafamento deste e obrigando ao emprego de metodologias extraordinárias para garantir a estabilidade microbiológica. Numa indústria cada vez mais exigente e em que o tempo significa literalmente dinheiro, fermentações mais prolongadas podem significar perdas económicas significativas.

Uma cultura 'starter' pode ser definida como uma preparação constituída por um número elevado de células de pelo menos um microorganismo a ser adicionada a uma matéria prima, acelerando e dirigindo o seu processo fermentativo com o intuito de produzir um elemento fermentado seguro e de elevada qualidade.

A inoculação do mosto com 'starters' de estirpes puras seleccionadas (comerciais) após supressão das populações naturais por sulfitação minimiza a proliferação das leveduras selvagens e o seu impacto na qualidade do vinho. Disto resulta uma consistência no produto final que vai de acordo com os interesses tanto do produtor como do consumidor.

O uso de estirpes 'starter' comerciais pode, no entanto, mitigar as propriedades regionais, intrínsecas e características de alguns vinhos (Cappello *et al.* 2004). Uma vez que a qualidade do vinho é consequência directa da microbiota típica que se desenvolve durante a fermentação, existe uma procura cada vez maior de estirpes autóctones regionais que representem as propriedades enológicas consideradas características de uma determinada região (Romano *et al.* 2008; Climente-Jimenez *et al.* 2004).

Neste contexto seria preferencial o uso de culturas 'starter' compostas por estirpes autóctones isoladas e seleccionadas de uvas de uma determinada região. Ao estarem potencialmente melhor adaptadas ao crescimento num mosto específico, permitem uma optimização da fermentação e uma conservação da tipicidade local, sem resultarem numa diminuição da qualidade (van der Westhuizen *et al.* 2000; Versavaud *et al.* 1995).

Nos vinhos alguns investigadores defendem o uso de leveduras seleccionadas regionalmente; estas desempenham um papel fundamental enaltecendo as propriedades sensoriais dos vinhos regionais típicos comparativamente as estirpes comerciais 'starter' desenvolvidas essencialmente para

levarem a cabo fermentações completas de forma rápida, sem produção de sabores desagradáveis e de modo a garantirem produtos estáveis (Rainieri & Pretorius 2000).

Estes investigadores salientam a preocupação de nos projectos mais recentes de selecção de leveduras para vinificação, ser dado relevo a estirpes autóctones ecotípicas, tentando preservar a biodiversidade nas áreas de selecção e ao mesmo tempo garantir no vinho características ligadas à região de proveniência.

Durante o ano de 2007, em parceria com a Sogrape Vinhos S.A e a PROENOL - Indústria Biotecnológica, Lda, isolaram-se 768 leveduras de 89 mostos provenientes de quatro regiões nacionais denominadas origem controlada (DOC) (Dão, Bairrada, Porto e Douro e Alentejo). O presente trabalho visa a identificação, nesta colecção, de leveduras que estejam particularmente adaptadas para a realização da fermentação alcóolica mantendo a qualidade que é associada aos vinhos da Sogrape. O trabalho foi dividido em 3 Fases distintas e sequenciais. A Fase I consistiu na aplicação de métodos moleculares de 'fingerprinting' de forma a poder caracterizar genomicamente a colecção de isolados. Pretendeu-se assim, estudar a variabilidade da colecção de leveduras e excluir isolados presentes na colecção com interesse enológico duvidoso.

A Fase II consistiu em ensaios de crescimento em diferentes condições levados a cabo por microfermentações de mosto em microplaca. Desta forma pretendeu-se estudar o comportamento individual de cada isolado em diferentes condições comparativamente a uma estirpe comercial tipicamente usada em vinificações.

A Fase III consistiu na análise comparativa de diferentes métodos moleculares de diferenciação por 'PCR-fingerprinting' de forma a encontrar potenciais 'fingerprints' passíveis de utilização como marcadores moleculares para rastreio inequívoco dos isolados durante futuras fermentações industriais.

Ao longo do estudo, foi ocorrendo uma eliminação sequencial das leveduras com base no seu desempenho menos promissor relativamente a uma estirpe comercial que serviu de referência.

Fase I - Caracterização da colecção de leveduras por ‘fingerprinting’ molecular

Objectivos: Aplicação de métodos moleculares de diferenciação de modo a agrupar os diferentes isolados do ponto de vista genómico. Análise preliminar da variabilidade da colecção e eliminação de grupos indesejados.

1.1 Introdução

Biodiversidade ou diversidade biológica é a diversidade da natureza viva. Embora não exista uma definição exacta e consensual, a biodiversidade pode ser rudimentarmente descrita como uma "medida da diversidade relativa entre organismos presentes em diferentes ecossistemas". Esta definição inclui diversidade dentro da espécie, entre espécies e diversidade comparativa entre ecossistemas. Como grande parte das forças motrizes da nossa sociedade actual, a biodiversidade adquiriu um papel preponderante a partir do momento em que nos apercebemos que o seu estudo poderia ser de uma importância económica relevante.

Um dos factores determinantes da validade dos estudos ecológicos em leveduras é uma correcta identificação das espécies presentes num determinado ecossistema. Antes da evolução da era genómica e dos estudos taxonómicos actuais, a identificação das diferentes espécies baseava-se em testes fenotípicos. Embora o fenótipo possa muitas vezes ser usado para identificar correctamente as espécies, os testes fenotípicos são de difícil implementação, morosos e, tal como demonstrado por análises moleculares, muitas vezes resultam em identificações incorrectas (Foschino *et al.* 2004; Kurtzman 1998).

Tendo em conta a elevada dimensão da colecção de isolados, a morosidade e menor fiabilidade da discriminação com base nos métodos típicos de caracterização fenotípica, optou-se por primeiro reduzir o número de isolados da colecção. Desta forma pretendia-se, por métodos moleculares, não só analisar a variabilidade intrínseca da colecção como detectar isolados que não fossem de interesse enológico potencial.

As técnicas baseadas na reacção de amplificação em cadeia pela polimerase (‘Polymerase Chain Reaction’ ou PCR), ao contrário de métodos moleculares como a cariotipagem, exigem apenas quantidades reduzidas de DNA, são de fácil execução e permitem uma rápida obtenção de resultados. Dependendo dos ‘primers’ usados é possível uma diferenciação inter ou intra-específica mesmo sem um conhecimento prévio das sequências de DNA a analisar.

A análise de DNA por métodos de ‘PCR-fingerprinting’ foi já previamente descrita pela capacidade na discriminação de leveduras em amostras clínicas (Gaitanis *et al.* 2009), alimentos (Andrade *et al.* 2006), biocombustíveis (Alves da Silva-Filho *et al.* 2005) e bebidas fermentadas (Capece *et al.* 2003).

A análise de ‘fingerprints’ gerados por polimorfismos de mini/microsatélites (‘mini/micro-satellite primed PCR’, MSP-PCR), baseia-se no uso de um ‘primer’ único com homologia a minisatélites ou microsatélites dispersos no genoma. A ligação do ‘primer’ a regiões específicas permite a amplificação de sequências genómicas entre esses mini/microsatélites. O produto final consiste numa série de fragmentos de massa molecular variável que, quando separados por electroforese em gel de agarose, geram perfis de bandas característicos do microrganismo (Soll 2000).

Para além de ser uma técnica rápida, de fácil implementação e relativos baixos custos, tem um elevado poder discriminatório a nível de espécie.

De forma a avaliar qual o 'primer' com a maior capacidade de discriminação, analisaram-se os 'primers' de 'MSP-PCR' (GTGC)₄, (GTG)₅, (GACA)₄ e csM13 (Alves *et al.* 2007; Meyer *et al.* 1993). Após selecção do 'primer' csM13 construíram-se dendrogramas representativos das relações de proximidade genómica entre os isolados para avaliação da diversidade global da colecção e da diversidade intrínseca a cada região de origem.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 A colecção

As 768 leveduras usadas neste estudo consistem numa colecção de leveduras isoladas de 89 mostos fornecidos pela Empresa Sogrape Vinhos S.A. durante o ano de 2007. A cada amostra de mosto recebida fizeram-se diluições seriadas, seguidas de inoculação em meio WL Nutrient Agar (Oxoid). Na sua composição o meio WL Nutrient Agar contém verde de bromocresol (indicador de pH) que, após assimilação pelas leveduras, resulta em colónias de cores diferentes dependentes do metabolismo diferencial de cada espécie/estirpe.

Com base na dimensão, cor e morfologia das colónias de leveduras obtidas em meio WL Nutrient Agar, seleccionaram-se as diferentes colónias para isolamento em cultura pura e conservação a -80°C no laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do BioFIG (LMB-BioFIG/ICAT).

Na Tabela 1.1 está indicada a distribuição das leveduras puras obtidas consoante as a região Denominada Origem Controlada (DOC) de onde proveio o mosto do qual foram isoladas.

Tabela 1.1 Distribuição das leveduras da colecção por regiões Denominadas Origem Controlada (DOC) e respectivas sub-regiões de isolamento.

Região DOC	Código de sub-região de origem	Número de mostos analisados	Número de isolados por sub-região
Alentejo	AL	4	24
Dão	DA1	38	326
	DA2	18	149
Porto e Douro	DO1	14	172
	DO2	9	69
Bairrada	BA	6	29
TOTAL	6	89	769

A cada um dos isolados foi atribuído um número de 1 a 769 para facilitar a sua identificação. Foi ainda acrescentada à colecção uma levedura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) à qual se atribuiu o número 771.

Durante a extracção de DNA, não foi possível a reactivação da levedura identificada com o número 217 e conservada a -80°C juntamente com o resto da colecção. Este isolado foi considerado não viável e não foi incluído em nenhuma parte deste estudo. No entanto, por razões logísticas, manteve-se a numeração inicialmente atribuída aos outros isolados.

1.2.2 Extracção de DNA genómico

Para extracção de DNA, as leveduras da colecção foram inoculadas em meio de cultura PDA (Biokar Diagnostics) com 2% agar (p/v) durante 24 a 48h, a 25°C para confirmação da pureza dos isolados. Colónias isoladas foram inoculadas em microtubos com 2 ml de meio de cultura 'Yeast Extract Peptone Glucose' (YEPG) contendo, por litro de água desionizada,: glucose, 1,0 g; polipeptona, 2,0 g; extracto de levedura, 0,2 g; e NH_4NO_3 , 0,2 g (pH 7,0).

Após um período de crescimento de 48 horas à temperatura ambiente com agitação, as células foram lavadas com TE (10 mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA), recolhidas por centrifugação (18000 g, 10 minutos) e ressuspendidas em 500 µl de tampão de lise (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,3% SDS; pH 8,0). Após junção de cerca de 200 µl de microesferas (425-600 µm 'acid washed'), os microtubos foram ao vórtex durante 5 minutos, seguindo-se incubação durante 1 hora a 65°C e novamente vórtex de 5 minutos. Após nova centrifugação (18000 g, 10 minutos), o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e tratado com 3 µl de RNase (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Para separação dos ácidos nucleicos adicionou-se 500 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturou-se por inversão, centrifugou-se (18000 g, 10 minutos, 4°C). Ao sobrenadante adicionou-se 50 µl de NaAc (3M; pH 5,2; 4°C), 1375 µl de etanol absoluto frio (-20°C), misturou-se por inversão e centrifugou-se (18000 g, 10 minutos, 4°C). O 'pellet' foi lavado com 1 ml de etanol a 70% e ressuspendido em 100 µl de tampão TE. O DNA foi guardado a 4°C.

1.2.3 'Primers' e condições de amplificação

Os isolados da colecção foram analisados por MSP-PCR usando como 'primers' únicos os oligonucleótidos homólogos de microsátélites [(GTG)₅; (GACA)₄; (GTGC)₄] e minisátélites [csM13 (5'- GAGGGTGGCGTTCT -3'')]. Para estudo de qual o melhor 'primer' a utilizar testaram-se, para todos os 'primers', as mesmas condições. Fizeram-se reacções de 50 µl contendo 1X tampão de reacção, 1 U de Taq DNA Polimerase, 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato, 2,5 mM MgCl_2 , 100 pmol de 'primer' e 1 µl de DNA diluído 1/10 da extracção inicial. Todos os reagentes provieram da Invitrogen (Paisley, UK).

As condições de amplificação no termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Alemanha) consistiram em: um ciclo inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 2 min a 72°C e uma extensão final de 6 min a 72°C (Lemsaddek 2008). Os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0.5 X (Invitrogen, Paisley, UK) a 80 V durante 3 h. Após coloração com brometo de etídio, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema Kodak 1D (Kodak, Rochester, NY, USA).

As amplificações posteriores com os 'primers' (GTGC)₄ (190 isolados) e csM13 (768 isolados) decorreram nas condições acima referidas excepto que o volume final de reacção foi de 25 µl.

1.2.4 Análise dos perfis de 'fingerprinting' gerados por csM13

As imagens adquiridas foram tratadas com o software Bionumerics® versão 4.61 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Após normalização das imagens correspondentes a cada perfil de 'fingerprinting', foram obtidos os respectivos perfis densitométricos e aplicado o coeficiente de correlação de Pearson. A análise numérica dos perfis de 'fingerprinting' e a associação entre as estirpes foram determinadas por aglomeração hierárquica utilizando a média aritmética não ponderada (UPGMA).

A avaliação da qualidade do dendrograma como representação da matriz de semelhança foi efectuada pelo coeficiente de correlação cofenética (ρ ; Sneath & Sokal 1973).

A reprodutibilidade obtida para os diferentes métodos foi determinada através do cálculo da média dos índices de similaridade para 10% das estirpes isoladas (seleccionadas aleatoriamente) e respectivas réplicas, as quais foram utilizadas em experiências independentes.

1.3 Resultados e Discussão

A aplicação dos métodos de 'fingerprinting' genómico referidos anteriormente resultou em perfis polimórficos com bandas bem individualizadas para os isolados analisados.

Os diferentes perfis obtidos em gel estão ilustrados na Figura 1.1

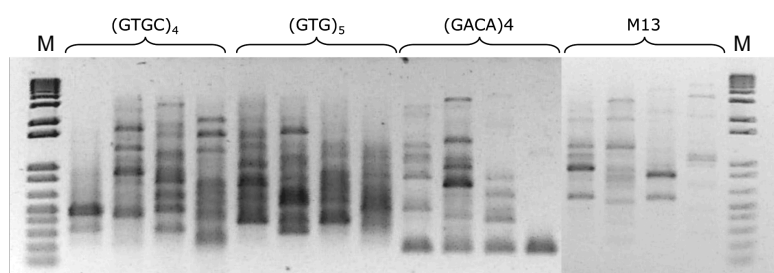


Figura 1.1 Perfis de 'fingerprinting' molecular obtidos com a técnica de MSP-PCR. M corresponde ao marcador de massas moleculares 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Com base nos resultados obtidos (Figura 1.1), nomeadamente intensidade relativa e número de bandas dos perfis, seleccionou-se o 'primer' (GTGC)₄ como o mais adequado.

No entanto, quando este 'primer' foi aplicado a uma amostra de 190 isolados da colecção, a maioria dos perfis obtidos revelou-se com pouca resolução (dados não apresentados), obrigando à selecção e emprego do 'primer' csM13 para a caracterização global da colecção.

Uma análise dos perfis de MSP-PCR csM13 obtidos para os 768 isolados (ilustrado na Figura 1.2) com recurso ao software Bionumerics® permitiu a construção de um dendrograma global (Figura 1.4), representativo das relações de proximidade genómica entre isolados.

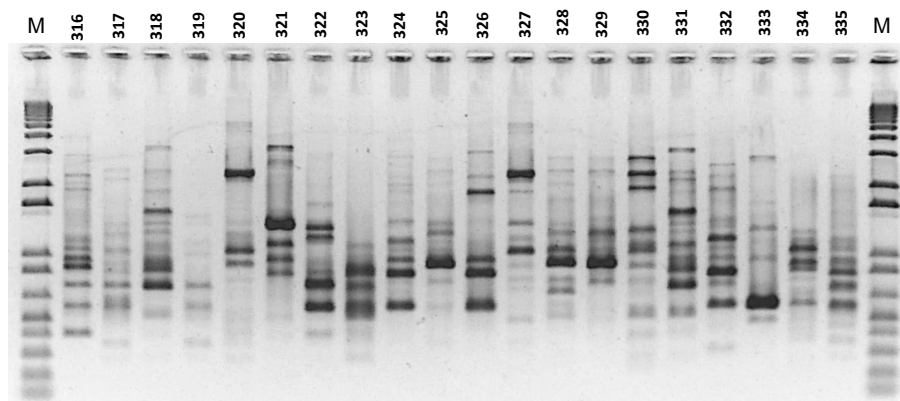


Figura 1.2 Perfis de 'fingerprinting' molecular obtidos em 20 isolados com a técnica de MSP-PCR usando o 'primer' csM13. M corresponde ao marcador de massas moleculares 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen). O número de cada poço corresponde ao número do isolado nele aplicado.

Quando conjugados os dados recolhidos durante o isolamento das leveduras, nomeadamente cor e morfologia das colónias de leveduras obtidas em meio WL Nutrient Agar, com os perfis de 'PCR-fingerprinting' observou-se uma dispersão dos isolados não coerente com a cor e morfologia registados. A construção de dendrogramas individuais por cor de colónias revelou uma elevada heterogeneidade entre os isolados (Tabela 1.2) estando as cores mais frequentemente observadas (Branco, Verde Claro e Verde Escuro) associadas aos níveis de semelhança mais baixos (11,71%, 8,55% e 10,79%, respectivamente). Estes resultados questionam a coerência e fiabilidade taxonómica dos dados morfológicos registados.

Considerando que, pela sua composição, o meio WL Nutrient Agar resulta em colónias de cores diferentes dependentes do metabolismo diferencial de cada espécie/estirpe, o expectável seria que isolados com cores iguais apresentassem maiores índices de semelhança que os observados (Pallmann *et al.* 2001). Ainda que a técnica de 'PCR-fingerprinting' e o coeficiente de correlação escolhidos sejam altamente discriminativos, maiores índices de semelhança observados para cores mais distintas como o rosa (39,36%) e o castanho (43,49%) levam a crer que a heterogeneidade registada para as cores mais frequentes se deve mais a fenómenos de subjectividade na atribuição das cores que a diferenças taxonómicas entre os isolados da mesma cor.

Tabela 1.2 Distribuição dos isolados na colecção por cor/morfologia das colónias em meio WL nutrient agar durante isolamento. Estão também indicados os índices de semelhança mínimo, número de 'clusters' a 50% de semelhança e número de 'clusters' a 50% constituídos por apenas 1 isolado observados nos dendrogramas (Pearson/UPGMA), individuais para cada cor. NID - Não identificado

Cor/morfologia das colónias	Nº de isolados	Índice de semelhança mínimo	Nº de 'clusters' a 50% semelhança	Nº de 'clusters' com apenas 1 isolado
Amarelo	8	25.03%	3	1
Branco	317	11.71%	38	7
Castanho	7	43.49%	2	0
Filamentosa	40	22.01%	5	1
Grená	18	36.09%	3	1
Rosa	43	39.36%	2	1
Salmão	52	37.4%	4	2
Verde Claro	143	8.55%	20	7
Verde Escuro	120	10.79%	15	6
NID	20	7.51%	8	3

Com o fim de comparar o grau de diversidade relativa entre sub-regiões, construíram-se dendrogramas individuais por sub-região (dados não apresentados). Em cada dendrograma designou-se um nível de corte de 90% de semelhança (correspondente à reprodutibilidade observada para o método de 'fingerprinting') como limite da capacidade de diferenciação do método. Em termos práticos, isto significa que isolados com índices de semelhança igual ou superior a 90% não podem ser considerados genomicamente distintos.

Tendo em conta a desigualdade do número de isolados por sub-região, optou-se por aplicar o índice de diversidade de Simpson (Hunter & Gaston 1988) para avaliação da diversidade global da colecção de isolados e a diversidade intrínseca a cada sub-região. Por observação do dendrograma global designou-se um nível arbitrário mínimo de 50% de semelhança para delimitação dos diferentes grupos genómicos.

Como se pode observar na Figura 1.3, a maior diversidade foi observada para as sub-regiões “DA2” (149 isolados), “AL” (24 isolados) e “DA1” (326 isolados). A menor diversidade registou-se na sub-região “DO1” (172 isolados).

Estes dados evidenciam uma ausência de correlação entre o número de isolados e a diversidade genómica observada. Tendo em conta a uniformidade do processo de isolamento aplicado às amostras de todas as sub-regiões, estes resultados indiciam diferenças notórias nas comunidades de leveduras autóctones existentes nas várias sub-regiões.

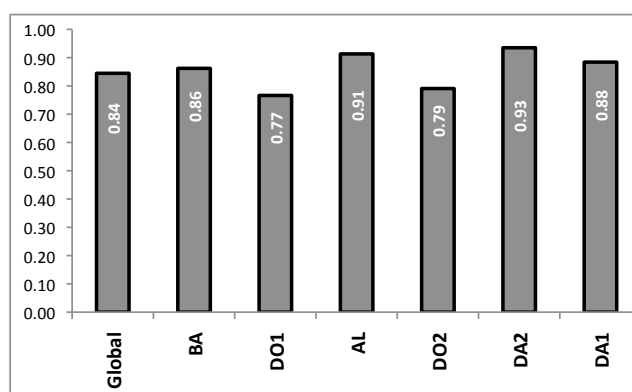


Figura 1.3 Níveis de diversidade de Simpson global e por sub-região observados na colecção de isolados por csM13 MSP-PCR.

No que toca ao dendrograma global (Figura 1.4), por observação da figura e estabelecendo uma linha de corte situada aproximadamente a 30% de semelhança, é possível a delineação de 6 ‘megaclusters’ distintos (I a VI) compostos por um número mínimo de 20 isolados cada. À medida que o nível de semelhança sobe para 50%, o número de ‘clusters’ aumenta para 41 e no limite da diferenciação da técnica (90%), definindo grupos mínimos de 5 elementos, contam-se ainda 18 ‘clusters’ diferentes (dados não apresentados). Dentro destes ‘clusters’ incluem-se isolados pertencentes a sub-regiões diferentes apontando para, o que se considera ser, uma distribuição ubíqua de algumas espécies/estirpes.

No dendrograma global é possível observar também que a grande maioria do grupo de leveduras descritas como sendo filamentosas (35 em 40) apresenta uma certa coerência genómica ao estabelecer um grupo definido dentro do ‘megacluster’ II (‘subcluster’ II(b); 63,4% de semelhança). Ainda que os valores de semelhança obtidos pelo dendrograma individual para leveduras filamentosas tenham sido relativamente baixos (22%) este agrupamento dentro do dendrograma global leva a considerar que se tratam de isolados genomicamente semelhantes. A estirpe comercial 771 por sua vez, apresenta-se no ‘megacluster’ IV. A existência de um ‘subcluster’ IV(b) com 64,7% de semelhança, onde se insere a estirpe comercial leva a crer que este ‘subcluster’ é composto por isolados pertencentes à espécie *S. cerevisiae*.

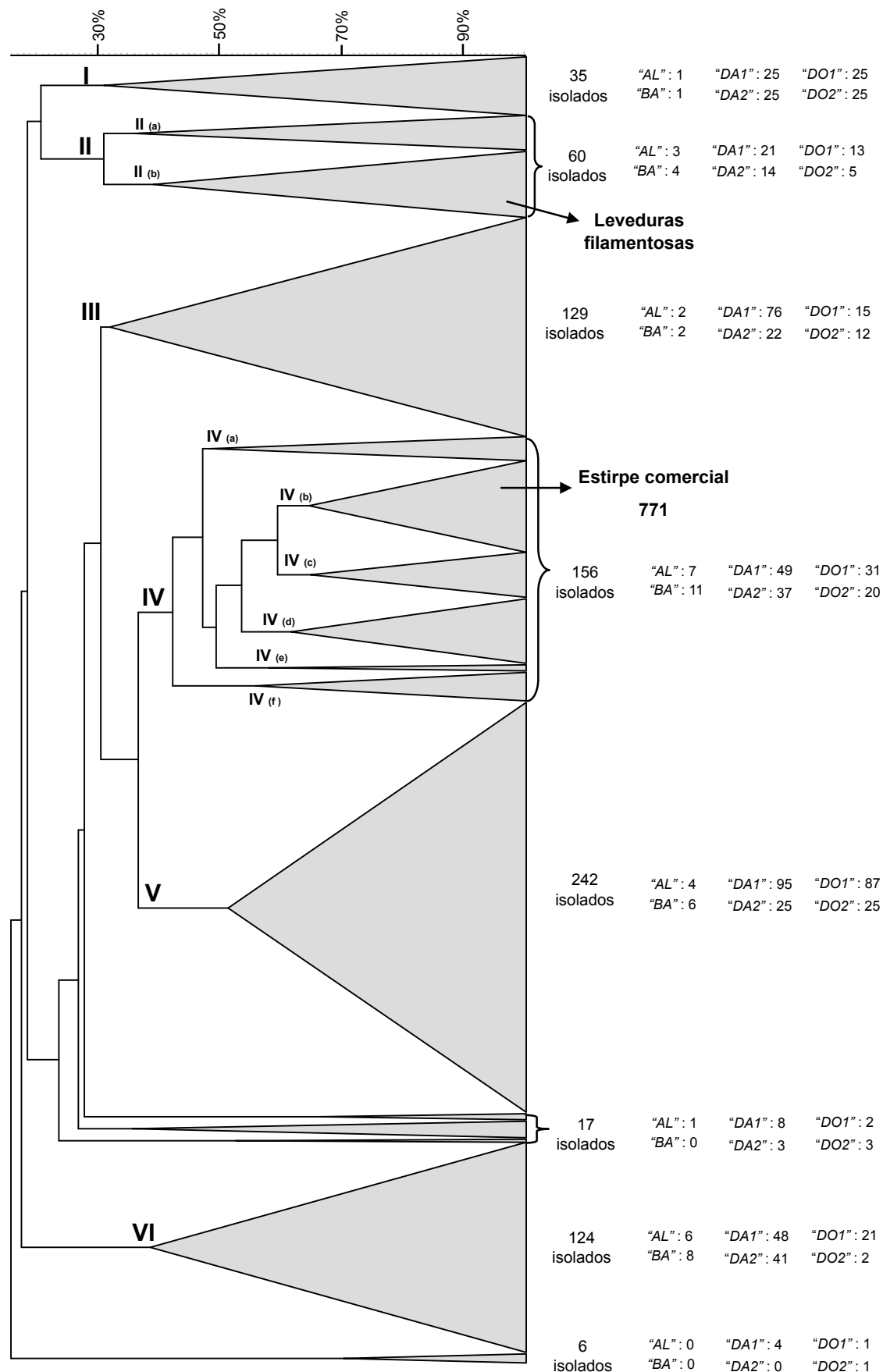


Figura 1.4 Dendrograma simplificado representativo dos perfis dos 768 isolados e da estirpe comercial 771, obtidos por MSP-PCR com o 'primer' csM13. Os números I a VI representam os 6 'megaclusters' definidos. Está também indicado o número de isolados observado para cada 'megacluster' e a sua respectiva distribuição por sub-regiões ("AL", "BA", "DA1", "DA2", "DO1", "DO2").
(Coeficiente de correlação de Pearson; método de aglomeração UPGMA; $\rho = 0,76$)

1.4 Conclusões

Como ferramenta de caracterização da diversidade global dos isolados, a técnica de ‘MSP-PCR fingerprinting’ com o ‘primer’ csM13 apresenta um elevado poder de diferenciação. Esperava-se que existisse uma certa correlação entre identidade genómica e características morfológicas identificadas durante o isolamento dos isolados. A dispersão pouco organizada dos isolados consoante as cores das colónias registadas em meio WL Nutrient Agar durante o isolamento levou à criação de dendrogramas individuais por cor de colónia (dados não apresentados) de forma a avaliar a respectiva variabilidade intrínseca. Os baixos valores de semelhança observados (Tabela 1.2) podem ser explicados de duas maneiras: i) os isolados apresentam uma enorme variabilidade genómica que não é diferenciável pela coloração diferencial observada no meio ou; ii) a enorme subjectividade na atribuição das cores resulta em menor ou maior diferenciação que a real. Considerando que os menores índices de semelhança foram observados para cores mais subjectivas como branco e verde (meio WL Nutrient Agar é verde), assume-se que estes resultados são mais produto de erro experimental que diferenças a nível metabólico das leveduras. Apesar de tudo, os isolados identificados como “filamentosos”, no dendrograma global da colecção formaram um grupo definido dentro do ‘megacluster’ II e com um índice de semelhança de 63,4%. Ainda que este não seja um valor elevado, tendo em conta a elevada variabilidade global da colecção e considerando que as leveduras filamentosas tendencialmente estão associadas a degradação da qualidade e à produção das comumente designadas doenças do vinho (Volleková *et al.* 1996), optou-se por excluir este grupo de 40 isolados nos estudos subsequentes. Quanto ao ‘subcluster’ onde se insere a estirpe comercial 771, a potencial existência de isolados pertencentes à espécie *S. cerevisiae* é uma descoberta importante, visto que esta espécie é a espécie de eleição em fermentações de vinhos. No entanto, é do interesse do estudo não restringir a colecção de isolados apenas à espécie *S. cerevisiae*.

No que toca à diversidade genómica das sub-regiões, a elevada variabilidade genómica observada dentro destas é consistente com estudos anteriores onde, mediante métodos moleculares de identificação, foi demonstrada uma enorme diversidade de perfis genéticos entre a flora fermentativa enológica de várias regiões vinícolas (Schuller *et al.* 2005; Esteve-Zarzoso *et al.* 2000; Pramateftaki *et al.* 2000). Por outro lado, a detecção de perfis genómicos comuns entre sub-regiões diferentes pode ser indicação de uma distribuição mais vasta de determinadas espécies/estirpes frequentemente associadas a regiões enológicas.

Com base nos resultados desta fase, diminuiu-se então o número de isolados da colecção em estudo para 728.

Fase II - Selecção de leveduras por critérios clássicos

Objectivos: Aplicação sequencial de critérios clássicos de selecção de 'starters' aos 728 isolados resultantes da Fase I. Eliminação das leveduras que não preenchem os critérios definidos e identificação dos isolados seleccionados.

2.1 Introdução

O mosto é composto pelos seguintes constituintes principais: água, açúcares (glucose, frutose, pentose, pectina), compostos azotados (aminoácidos e proteínas), ácidos (tartárico, málico), sais minerais, taninos, pigmentos, vitaminas, enzimas e compostos aromáticos (Benda 1982). A forma como cada levedura se adapta e/ou usa cada um dos constituintes do mosto é determinante da sua capacidade de levar a cabo uma fermentação bem sucedida.

Já foi demonstrado que as estirpes estão perfeitamente adaptadas às condições do microambiente do qual foram isoladas (Esteve-Zarzoso *et al.* 2000). Alguns enólogos afirmam que os bons resultados só são mesmo obtidos usando estirpes 'starter' autóctones da zona de colheita das uvas. Apesar das características regionais e individuais de cada espécie/estirpe, todas as boas estirpes 'starter' partilham características básicas comuns. Estes critérios mínimos de eleição baseiam-se em parâmetros enológicos há muito estabelecidos e entre os quais se salientam a cinética de fermentação, a tolerância a metabolitos secundários gerados e a capacidade de fermentar completamente os açúcares (Lonvaud-Funel 2002). Com base nestas características e de acordo com critérios definidos em conjunto com a Sogrape e a Proenol, definiu-se uma estratégia de emprego de 5 ensaios sequenciais explicados de seguida. Assim, cada uma das 728 leveduras foi inoculada em diferentes meios de forma a testar a sua resposta a determinadas condições. Por relativização da resposta individual de cada isolado com a resposta da estirpe comercial 771, inoculada nas mesmas condições, foi possível uma eliminação sequencial dos isolados que não preenchessem os critérios mínimos. Salienta-se que, de forma a racionalizar a quantidade de análises e acelerar o processo de selecção, ocorreu uma redução do número de leveduras em estudo após o ensaio 1 (728 -> 342) e após o ensaio 4 (342 -> 33) com base nos resultados até aí observados.

Em simultâneo e com o objectivo de identificar os isolados seleccionados no ensaio 1, procedeu-se à amplificação por PCR da região D1/D2 do gene do RNA ribossomal da subunidade maior (rRNA 26S). A região D1/D2 engloba uma porção de cerca de 600 nucleótidos e apresenta uma conservação intra-específica que a tornam, hoje em dia, o alvo de excelência para identificação molecular de leveduras. Actualmente um dos conceitos de definição de espécie de leveduras (Kurtzman & Robnett 1998) define espécie como um grupo de estirpes que mostrem menos de 1% de diferenças nucleotídicas no domínio D2 (c.a 300 nucleótidos).

2.1.1 Ensaio 1

Características a testar: - **Capacidade de crescer em meio líquido (mosto)**
- **Osmotolerância a 150 g/l de glucose + frutose**

Embora o mosto seja um meio relativamente completo ao nível nutricional, só permite o crescimento de um número limitado de espécies. O baixo pH e elevado teor de açúcares (maioritariamente

glucose e frutose) provenientes das uvas exercem tal pressão selectiva nos microrganismos que poucos conseguem crescer. Com o decorrer da fermentação depressa se estabelecem condições anaeróbias restritivas que vêm reforçar ainda mais a pressão selectiva do mosto. Um rápido consumo de nutrientes essenciais (aminoácidos, proteínas, vitaminas...), conjugado com o aumento da concentração de álcool, rapidamente leva à eliminação de microrganismos menos adaptados, garantindo que apenas os organismos com o catabolismo fermentativo mais eficiente sejam favorecidos (Pretorius 2000).

2.1.2 Ensaio 2

Características a testar: - *Sensibilidade ao pH (crescimento a pH 2,7; 3,0; 3,2)*
- *Sensibilidade ao cobre (Cu^{2+} = 3 mg/l; pH 3,35)*

Dos inúmeros factores que afectam a qualidade do vinho, um dos mais importantes é o pH deste. O pH do mosto e vinho afecta o sabor, a textura, a cor, o “bouquet” e o desenvolvimento de potenciais organismos contaminantes (principalmente bactérias).

O pH do mosto tipicamente varia entre 3,0 e 3,9 dependendo das concentrações dos principais ácidos (málico e tartárico) que o compõem. Do ponto de vista microbiológico, estes baixos valores de pH apresentam um dualismo selectivo antagónico. As bactérias geralmente preferem ambientes mais alcalinos e não se desenvolvem, limitando assim a susceptibilidade do mosto a contaminação. Nas leveduras, embora estes níveis de acidez sejam bem tolerados, observa-se um impacto no crescimento e na produção de metabolitos sensoriais importante (Heard & Fleet 1988). A valores de pH mais baixos ocorre uma maior produção e protecção de aromas no entanto, as taxas de crescimento e fermentação diminuem drasticamente, aumentando o risco de fermentações paradas ou lentas (Jackson 2000).

O mosto pode conter elevadas concentrações de cobre (até 5 mg/l). Quando em concentrações residuais o cobre, substância activa de algumas enzimas, é um composto ubíquo e indispensável para o normal funcionamento das plantas; no entanto em doses elevadas é tóxico. Embora parte do cobre no mosto seja proveniente das vinhas e uvas, a maior parte é originária de ‘sprays’ que, baseados nas propriedades desinfectantes do sulfato de cobre, são usados na prevenção do míldio das vinhas (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006a). Ainda que o excesso de cobre seja eliminado durante a fermentação, sendo reduzido a sulfitos que precipitam e são removidos juntamente com as leveduras e borras do vinho durante a trasfega do vinho, uma dose elevada deste pode inibir a fermentação nas suas fase iniciais (Azenha *et al.* 2000; Sarais *et al.* 1994).

2.1.3 Ensaio 3

Características a testar: - *Cinética de crescimento a 220 g/l de açúcares; pH 3,35*
- *Sensibilidade ao etanol (até 9% v/v; pH 3,35)*
- *Sensibilidade ao SO_2 livre (15 mg/l; pH 3,35)*

A concentração de açúcares no mosto tem um efeito antagónico. Ainda que uma maior concentração implique maior disponibilidade de fontes de carbono resulta num ambiente com uma elevada pressão osmótica. A elevadas concentrações os transportadores membranares de açúcares sofrem ainda inibição pelo substrato e o influxo de fontes de carbono diminui. Isto afecta o crescimento das leveduras e pode resultar num aumento da fase de latência e diminuição da taxa de crescimento, da

biomassa celular total e da tolerância ao etanol nas fases finais da fermentação. Apesar da sensibilidade variável que cada estirpe/espécie apresenta a diferentes concentrações de açúcares totais, foi observado que todas as leveduras apresentam uma depressão do crescimento celular a elevadas concentrações (Charoenchai *et al.* 1998; Hohmann 2002).

Todos os álcoois são tóxicos a partir de um determinado teor. Embora os mecanismos de actuação ainda não estejam completamente determinados, considera-se que a toxicidade dos álcoois deriva de alterações a nível da permeabilidade da membrana plasmática. A baixas concentrações (2% etanol), o gradiente electroquímico da membrana é alterado e ocorre supressão do influxo de açúcares (Santos *et al.* 2008). À medida que a concentração alcoólica do meio aumenta, outras funções da membrana celular começam a ser afectadas até ao ponto em que já não é possível manter a homeostasia osmótica e electroquímica intracelular. Acrescenta-se a estes problemas uma elevada osmolaridade do mosto, pelo que o resultado é uma rápida redução da viabilidade celular e a inevitável interrupção da fermentação alcoólica (Jackson 2000; Bauer & Pretorius 2000; Bisson 1999).

A sulfitação é uma prática que consiste na introdução de uma pequena dose de dióxido de enxofre (SO₂) num mosto ou num vinho. O SO₂ é um aditivo alimentar vulgarmente utilizado na indústria enológica pelas suas propriedades antisépticas, antioxidantes e antioxidásicas (inibição de enzimas oxidativas) (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006a). Em função do pH, o SO₂ total encontra-se em equilíbrio sob as formas de SO₂ livre (forma molecular, iões sulfito e bisulfito) e SO₂ combinado (com compostos carbonados)¹ (Jackson 2000). Nos valores de pH do vinho, o SO₂ livre está predominantemente sob a forma de ião bissulfito. A fórmula activa é a forma molecular. Apesar de indesejável em excesso (odor e sabor desagradável), quando adequadamente usado a sua acção antioxidante protege o aroma do vinho e ajuda no envelhecimento, sendo o crescimento de bactérias inibido pela sua acção antiséptica² (Fleet *et al.* 1984). Em relação às leveduras, observa-se um prolongamento da fase de latência que precede a fermentação alcoólica. Ao mesmo tempo, baixas concentrações de SO₂ livre têm um efeito estimulatório na taxa de fermentação alcoólica uma vez iniciada (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006a).

A sensibilidade ao SO₂ varia com a espécie e a estirpe (Constantí *et al.* 1998). Esta sensibilidade diferencial pode ser usada para modelar selectivamente o crescimento das leveduras indígenas do mosto favorecendo as estirpes 'starter', mais tolerantes (Andorrà *et al.* 2008).

2.1.4 Ensaio 4

Características a testar: - **Capacidade fermentativa**

- **Factor de conversão glucose/frutose em etanol**

As fermentações lentas ou incompletas são um problema crónico na enologia. Fermentações incompletas são aquelas que terminam deixando uma concentração de açúcares no mosto acima da desejada. Normalmente, quando os níveis residuais de açúcares (glucose e frutose) estão abaixo de 4 g/l a fermentação considera-se terminada (Alexandre & Charpentier 1998). Uma fermentação lenta caracteriza-se por demorar uma maior quantidade de tempo até atingir os valores residuais de açúcares. O lento consumo de açúcares pelas leveduras é normalmente um sinal que as condições de fermentação não são adequadas e é típico estas terminarem abruptamente deixando, no mosto, elevados níveis de açúcar. Uma vez que vinhos com elevados teores de açúcar são altamente

1. Por exemplo: aldeídos, cetonas, ácido pirúvico, ácido alfa-cetoglutarico e açúcares. O acetaldeído é o composto que preferencialmente reage com o SO₂.

2. Concentrações totais entre 5 e 10 mg/l são suficientes para inibir o crescimento de maior parte das bactérias existentes no mosto (Ribéreau-Gayon *et al.* 2006a).

susceptíveis a contaminações microbianas, as fermentações lentas ou paradas podem tornar-se um problema grave e dispendioso (Bisson 1999).

2.1.5 Ensaio 5

Características a testar: - Cinética de crescimento a 8°C

A temperatura à qual decorre a fermentação alcoólica afecta o crescimento e metabolismo das leveduras. Isto irá ter impacto na duração do tempo de fermentação mas, acima de tudo, na composição química e organoléptica do vinho. Diversos estudos demonstraram que fermentações decorridas a baixas temperaturas resultam numa diminuição da acidez volátil e num aumento da produção e retenção de compostos aromáticos activos nos vinhos, melhorando-os (Llauradó 2002; Torija 2002).

A maior produção de compostos aromáticos a baixas temperaturas pode estar correlacionada com o aumento de viabilidade observado. O stress induzido pelas baixas temperaturas resulta numa sobre-expressão de genes de resposta ao frio levando a alterações na membrana celular, no transporte intracelular de compostos, no metabolismo de fontes de carbono e na resistência a compostos tóxicos, nomeadamente etanol (Beltrani i Casellas 2005).

Por outro lado, baixas temperaturas induzem uma menor taxa de crescimento levando a um aumento do tempo de fermentação necessário e podendo mesmo resultar em fermentações lentas ou paradas (Heard & Fleet 1988).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Preparação dos isolados: reactivação e pré-inóculos

Para reactivação das células, todos os isolados foram inoculados em placas de PDA (Biokar Diagnostics) com 2% agar (p/v), directamente da colecção conservada a -80°C, e deixados a crescer um mínimo de 3 dias à temperatura ambiente. As placas foram isoladas com parafilme e guardadas a 4°C.

Para todos os isolados utilizaram-se inóculos padronizados (10^6 cfu/ml) a partir de um pré-inóculo, obtido por crescimento durante 12 a 16h em 2 ml de meio YEPG. Todos os pré-inóculos foram tornados equivalentes por leitura de absorvância a 520 nm em leitor de microplacas com aquisição automática de dados (Zenyth 3100, Anthos) e diluição em YEPG, em condições de assepsia controlada, antes de inoculação.

2.2.2 Preparação dos meios e condições de ensaio

Todos os meios usados nos ensaios foram elaborados a partir de mosto recebido da Sogrape/Proenol. Com base em boletins analíticos provenientes da Sogrape e Proenol, o mosto foi ajustado às condições referidas na Tabela 2.1 e filtrado através de uma membrana com poros de 0,45 µm (Millipore, Bedford, Mass., USA). Ao mosto corrigido deu-se a designação “Mosto Base”.

Todos os meios usados nesta fase são iguais em constituição ao “Mosto Base” excepto no(s) composto(s) em estudo para esse ensaio. Por exemplo, no estudo da sensibilidade ao cobre, o mosto usado é em tudo igual ao “Mosto Base” excepto na concentração do cobre.

Tabela 2.1 Constituição do Mosto Base e forma de correcção. Os itens marcados com (a) e (b) só foram ajustados nos ensaios 2 e 3, respectivamente.

Constituinte/ Característica	Concentração/ valor inicial	Concentração/valor final desejado	Ajustado com/por
Açúcares (glucose+ frutose)*	231,5 g/l	150 g/l	Diluição com água destilada
Azoto assimilável	149,8 mg/l	220 mg/l	Fosfato Diamónio
pH	3,34	3,34	Ácido Ortofosfórico (a)
Cobre	0,26 mg/l	< 3 mg/l	Sulfato de Cobre (a)
Dióxido de enxofre livre	12,8 mg/l	< 15 mg/l	Metabissulfito de Potássio (b)

* As principais fontes de carbono na fermentação são a glucose e a frutose e como tal, só os valores destes é que são analisados no mosto. Os valores indicados correspondem à medição dos açúcares totais e assume-se uma proporção de 50% glucose e 50% frutose.

Em todos os ensaios, os isolados foram inoculados em duplicado. Nos ensaios em microplaca, os isolados foram inoculados em microplacas diferentes e o primeiro poço de cada microplaca nunca foi inoculado para controlo de possíveis contaminações e para ser usado como valor de referência.

.1 Ensaio 1 - 728 isolados

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo liso por inoculação de 3 µl de pré-inóculo padronizado (ver 2.2.1) de cada um dos 768 isolados mais a estirpe controlo em 280 µl de “Mosto Base” (ver Tabela 2.1). A microplacas inoculadas foram incubadas a 15°C em estufa refrigerada com controlo de temperatura, sem agitação, durante um período mínimo de 96h.

.2 Ensaio 2 - 342 isolados

Este ensaio foi realizado em conjuntos de microplacas de 96 poços com fundo liso, cada conjunto correspondendo a uma das condições em estudo (pH=3,2; pH=3,0; pH=2,7 e cobre = 3 mg/l) .

Para o estudo da sensibilidade ao pH, o pH do “Mosto Base” foi ajustado para os valores de pH 3,2, 3,0 e 2,7 recorrendo a ácido ortofosfórico.

Para o estudo da sensibilidade ao cobre, ajustou-se a concentração de cobre do “Mosto Base” para 3mg/l com sulfato de cobre.

À semelhança do ensaio 1 (2.2.2.1), inoculou-se 3 µl de pré-inóculo padronizado de cada isolado seleccionado após o ensaio 1, em 280 µl de mosto corrigido para as condições acima mencionadas.

As microplacas inoculadas foram incubadas durante um mínimo de 96h, a 15°C, em estufa refrigerada, sem agitação.

.3 Ensaio 3 - 342 isolados

Este ensaio realizou-se em conjuntos de microplacas de 96 poços de fundo liso, cada conjunto correspondendo a uma das condições em estudo (açúcares = 220 g/l; etanol = 9%; SO₂ = 15 mg/l). O volume inicial de mosto corrigido foi igual às experiências anteriores (ensaio 1 e 2) exceptuando no estudo da sensibilidade ao etanol. Em todos os conjuntos de microplacas foram inoculados 3 µl de pré-inóculo padronizado de cada isolado seleccionado após o ensaio 1.

Para o estudo da cinética das leveduras à concentração de açúcares igual a 220 g/l, ajustou-se o mosto enviado pela Proenol/Sogrape para o valor de açúcares desejado, por diluição com água destilada. Os outros parâmetros foram ajustados de acordo com as condições anteriormente mencionadas para o “Mosto Base” (ver Tabela 2.1) . As placas foram incubadas durante um período mínimo de 96h, a 15°C, sem agitação.

No estudo da sensibilidade ao etanol, começando com um volume inicial de 250 µl de “Mosto Base” adicionou-se, a cada 24h, em cada poço, etanol absoluto de forma a aumentar em 3% a concentração de etanol em solução (v/v) até uma concentração final de 9% etanol ao fim de 72h. As placas foram seladas com MicroAmp® 96-Well Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) para impedir a evaporação da maior parte do etanol e furadas em cada poço com uma agulha estéril para impedir excesso de pressão no material. A incubação foi como referida anteriormente.

Para o estudo da sensibilidade ao SO₂ livre ajustou-se a concentração de SO₂ livre no “Mosto Base” para 15 mg/l recorrendo a metabissulfito de potássio e assumindo uma proporção teórica de 60% de SO₂ livre por cada molécula de metabissulfito de potássio.

As placas foram incubadas em estufa refrigerada, a 15°C, sem agitação, durante 14 dias.

.4 Ensaio 4 - 342 isolados

O estudo da capacidade fermentativa e do factor de conversão de glucose e frutose em etanol foi feito nas instalações da empresa Proenol segundo protocolo e condições da empresa. As fermentações decorreram em frascos selados, por inoculação de 900 µl de pré-inóculo padronizado em 90 ml de “Mosto Base” com açúcares ajustados para 220 g/l. O ajuste dos açúcares foi como mencionado no ensaio 3. Os frascos foram incubados a 15°C, sem agitação, durante 15 dias. Os valores de açúcares residuais e de glucose foram determinados pela Proenol no momento da inoculação e ao fim de 15 dias. O doseamento da glucose e da frutose foi realizado num analisador enzimático automático ABX Pentra 400 (Horiba Ltd; Irvine, California, USA). O kit enzimático foi o K-FRUGL (determinação simultânea de glucose e frutose) da Megazyme (Wicklow, Ireland) e foi utilizado segundo instruções do fornecedor.

A concentração de etanol no final da fermentação foi determinada pela empresa Sogrape recorrendo a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

.5 Ensaio 5 - 33 isolados

Para o estudo da cinética de fermentação a 8°C, 3 µl de pré-inóculo padronizado foram inoculados em 280 µl de “Mosto Base” com açúcares ajustados para 220 g/l em microplacas de 96 poços, fundo liso. As placas foram incubadas a 8°C em estufa refrigerada durante um período de 127h.

2.2.3 Determinação das taxas de crescimento

Para os ensaios decorridos em microplaca (ensaios 1, 2, 3 e 5), o crescimento foi avaliado por leituras de absorvância a 520 nm em leitor de microplacas com aquisição automática de dados (Zenyth 3100, Anthos), que foram efectuadas de duas em duas horas entre o período das 09h00 e as 17h00 durante pelo menos 96h após inoculação. Cada ponto de leitura foi determinado por 3 leituras consecutivas com 10 segundos de agitação prévia. A média das 3 leituras foi escolhida como o valor representativo do ponto de leitura. Os dados obtidos foram exportados para MICROSOFT®

EXCEL®, a média entre réplicas foi representada graficamente e, utilizando uma folha de cálculo expressamente construída para o efeito, aplicou-se o seguinte tratamento de dados:

- ▶ À média das réplicas de cada valor representativo de absorvância (A_t) subtraiu-se o valor inicial (A_0) de modo a que todas as curvas se iniciassem no ponto de coordenadas (0,0);
- ▶ Para cada curva de valores $A_t - A_0$ foi determinada a área debaixo da curva (AUC, 'Area Under Curve') por integração trapezoidal de cada intervalo de leituras (Δt) entre as 0 e as 96 horas (o valor deste último tempo, sempre que necessário, foi obtido por interpolação linear dos vizinhos enquadrantes);
- ▶ Ao valor de AUC para cada isolado foi subtraído o valor de AUC do branco respectivo a cada microplaca (meio não inoculado e incubado nas mesmas condições durante o mesmo tempo), obtendo-se a área líquida debaixo da curva (NAUC; 'Net Area Under Curve');
- ▶ Para além dos valores directos de NAUC obtidos para cada isolado, foram igualmente determinados os valores percentuais de NAUC relativamente à estirpe comercial controlo inoculada e incubada nas mesmas condições (NAUC relativa).

Assim, é possível não só ordenar os isolados em função do valor de NAUC, parâmetro integrado que mede o crescimento global do isolado, mas também seriá-los relativamente a uma estirpe habitualmente usada em vinificações.

Deve contudo salientar-se que o uso do parâmetro NAUC, embora integrativo, pode colocar como idênticos isolados que apresentem diferenças compensadoras nos parâmetros habituais de tempo de latência, taxa de crescimento e biomassa final.

2.2.4 Identificação molecular dos isolados seleccionados no ensaio 1

A identificação dos isolados seleccionados decorreu pela amplificação do domínio variável D1/D2 usando os 'primers' NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman & Robnett 1998). O volume de reacção foi de 50 μ l contendo, 1X tampão de reacção, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM de cada 'primer' e 1 μ l de DNA diluído 1/10 de DNA previamente extraído (ver 1.2.2). Todos os reagentes provieram da Invitrogen (Paisley, UK).

As condições de amplificação no termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Alemanha), consistiram em: um ciclo inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 6 min a 72°C.

Após purificação com kit 'Jetquick PCR product purification spin kit' (Genomed, Alemanha), os fragmentos foram sequenciados num sequenciador capilar automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) usando o kit 'dye terminator cycle sequencer start kit' (Beckman Coulter) e o 'primer' NL-4.

Seguidamente procedeu-se à análise de homologia com sequências disponíveis em bases de dados públicas por BLAST nucleotídico no site do 'National Center for Biotechnology Information' (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificação a nível de espécie.

2.2.5 Tratamento de dados

O tratamento estatístico dos dados observados no ensaio 1 foi feito por criação de tabelas de contingência em MICROSOFT® EXCEL® às quais se aplicou o teste do Qui-Quadrado para estudo

da associação dos parâmetros. Sempre que necessário, a identificação das variáveis associadas foi feita por subdivisão em tabelas independentes (Zar 1999). A escolha das 34 leveduras finais foi feita no software NTSYSPc versão 2.20d (Exeter Software) por análise multivariada dos componentes principais (PCA) dos valores de NAUC obtidos para cada condição nos ensaios 1, 2 e 3, juntamente com os dados resultantes do ensaio 4. A matriz de dados originais foi previamente normalizada por subtração da média e divisão pelo desvio padrão. Para facilitar a selecção, construiu-se em paralelo, um dendrograma usando o coeficiente de correlação de Pearson como medida de associação e o método de aglomeração UPGMA. Tal como em 1.2.4, calculou-se o coeficiente de correlação cofenética (ρ) para avaliar a qualidade da representação em dendrograma.

2.3 Resultados e Discussão

Um total de 728 isolados foram testados numa série de condições de forma a discriminar o seu potencial como leveduras ‘starter’ na produção de vinho. Os testes foram organizados em 5 ensaios que consistiram em microvinificações em mosto ajustado, de forma a determinar a capacidade de crescimento das leveduras em determinadas condições.

O primeiro ensaio consistiu no teste à capacidade de crescimento destas leveduras em “Mosto Base” a uma temperatura de 15°C (ver Tabela 2.1). Após a determinação dos valores de NAUC e NAUC relativa, os isolados foram ordenados e seriados. Uma representação dos valores da NAUC relativa encontra-se representada na Figura 2.1.

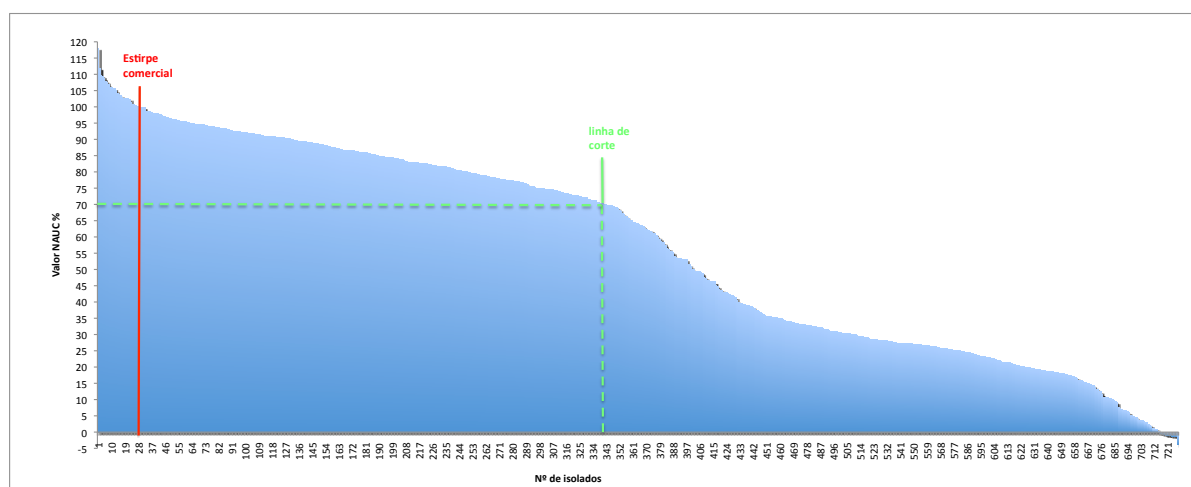


Figura 2.1 Seriação dos 728 isolados e da estirpe comercial de acordo com a NAUC relativa em relação à estirpe comercial após o ensaio 1. Encontra-se também assinalado o nível de 70% NAUC relativa escolhido como o nível de corte e selecção.

A distribuição dos isolados analisados em classes de percentagem de NAUC relativamente à estirpe comercial apresenta-se na Figura 2.2 e indicia a existência de duas sub-populações de isolados, uma com moda na classe de 80-90% e outra com moda na classe de 20-30%.

Tendo em conta o observado na Figura 2.1 e Figura 2.2, e de forma a minimizar o número de isolados a prosseguir nos ensaios seguintes, decidiu-se estabelecer um nível de corte no valor de 70% NAUC relativa. Assim, todos os isolados abaixo dos 70% foram eliminados permitindo uma redução da amostra em estudo para 342 isolados.

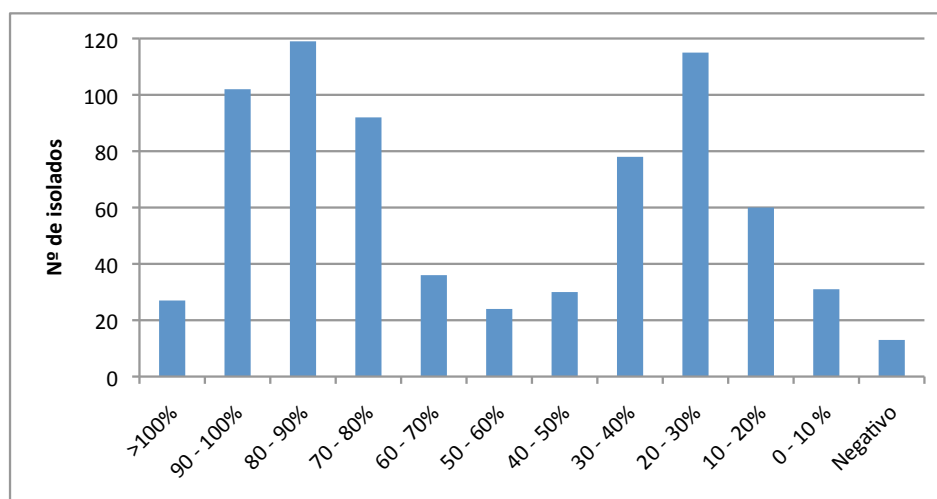


Figura 2.2 Distribuição dos 728 isolados por classes de acordo com a NAUC relativa.

A clara divisão em duas sub-populações observada na Figura 2.2 é um resultado interessante e suscita algumas questões no que toca a putativas relações taxonómicas existentes dentro da colecção. Para estudo destas relações e como forma de avaliação do processo de selecção instituído após o ensaio 1, decidiu-se sequenciar a região D1/D2 do rRNA 26S dos isolados seleccionados para identificação a nível de espécie. Num total de 342 isolados as espécies mais comuns pertenciam aos géneros *Metschnikowia* (157 isolados), *Candida* (75 isolados), *Lachancea* (44) e *Saccharomyces* (31) (Anexo 1). A ocorrência de um número superior de espécies não-*Saccharomyces* não é surpreendente. Está bem descrito que espécies pertencentes aos géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* e *Metschnikowia* são frequentemente isoladas de uvas e mosto, sendo responsáveis pelo início de muitas fermentações espontâneas (Torija *et al.* 2001; Di Maro *et al.* 2007; Clemente-Jimenez *et al.* 2004; Rainieri & Pretorius 2000). Geralmente estas espécies estão presentes em elevadas concentrações no início da fermentação mas vão morrendo à medida que esta progride, quando os nutrientes se esgotam e os níveis de toxicidade gerados pelos produtos secundários (etanol principalmente) acumulam (Fleet 2003). Tendo em conta o acima mencionado e se assumirmos os valores de NAUC de cada isolado como representação da sua capacidade global de crescer em “Mosto Base”, pôs-se a hipótese de haver uma associação entre género e os valores de NAUC relativa. Desta forma seria de esperar que géneros com espécies que crescem bem em mosto estivessem associados a valores de NAUC relativa mais elevados. Dividiu-se os valores NAUC em 2 grupos: grupo 1 $\geq 85\%$ de NAUC relativa e grupo 2 $< 85\%$ de NAUC relativa. Observou-se associação entre os géneros *Lachancea* ($p=0,0188$) e *Metschnikowia* ($p=0,020$) e o grupo 1 ($\geq 85\%$) e associação entre o género *Candida* ($p=0,000035$) e o grupo 2 ($<85\%$). O género *Saccharomyces*, composto exclusivamente pela espécie *S. cerevisiae* (Anexo 1), não apresenta associação com nenhum dos grupos. Este é um facto interessante que vem salientar a variabilidade de resposta intraespecífica que se pode obter, mesmo dentro de uma espécie há muito associada com enologia, e a importância de escolher adequadamente a estirpe a usar. De notar ainda é o facto que, neste ensaio, a estirpe comercial apresenta-se como o número 28 na serialização (Figura 2.1). Este resultado está de acordo com o já observado anteriormente em fermentações espontâneas (Fleet *et al.* 1984) (Heard & Fleet 1985). No início, a fermentação alcoólica é levada a cabo por espécies não-*Saccharomyces* que rapidamente atingem a fase estacionária. À medida que a

fermentação se desenvolve e a concentração alcoólica aumenta, o número destas espécies vai rapidamente diminuindo (Heard & Fleet 1988). Neste ensaio, o reduzido tempo de ensaio (96h) contribuiu como factor adicional de selecção. Se tivermos em conta que o padrão de crescimento das leveduras em mosto apresenta curtas fases de latência e exponencial e que o estado estacionário não resulta necessariamente da falta de nutrientes no meio (Ribéreau-Gayon 1985), 4 dias é o suficiente para a maioria das leveduras atingir a fase estacionária (Figura 2.4). Por outro lado, um período de 96h não é tempo suficiente para permitir o início da fase de declínio decorrente da toxicidade gerada pela acumulação de etanol na fermentação. Ainda que este ensaio nada nos diga sobre a qualidade dos vinhos produzidos e se baseie apenas no comportamento individual de cada isolado sem ter em conta efeitos de competição, é uma boa forma de eliminar rapidamente as leveduras autóctones incapazes de crescer em mosto. Isto permitiu reduzir o número de leveduras em estudo a cerca de metade (342) facilitando e acelerando o emprego dos ensaios seguintes. Para avaliar a representatividade da sub-amostra comparou-se a distribuição dos isolados seleccionados por sub-regiões com a distribuição correspondente aos 728 isolados testados (Figura 2.3). Como se observa na figura, e apesar da diferente origem geográfica, verifica-se uma elevada sobreposição entre as duas distribuições ($r= 0,97$). Isto significa que o subconjunto seleccionado manteve a mesma distribuição por sub-regiões que a colecção inicial, conservando a variabilidade original.

Ainda que a distribuição se mantenha, existe a possibilidade de algumas sub-regiões contribuírem com um maior número de espécies mais adaptadas ao crescimento em “Mosto Base” que outras. Foi-se então analisar efeitos de associação entre sub-regiões e os valores de NAUC relativa obtidos para todos os isolados. Para tal dividiram-se os valores NAUC relativa em 2 grupos: NAUC relativa $\geq 50\%$ e NAUC relativa $< 50\%$. Observou-se uma associação significativa entre a sub-região “DO1” e o grupo NAUC relativa $< 50\%$ ($p= 0,0001$) e a sub-região “DO2” e o grupo NAUC relativa $\geq 50\%$ ($p=0,0089$) (dados não mostrados).

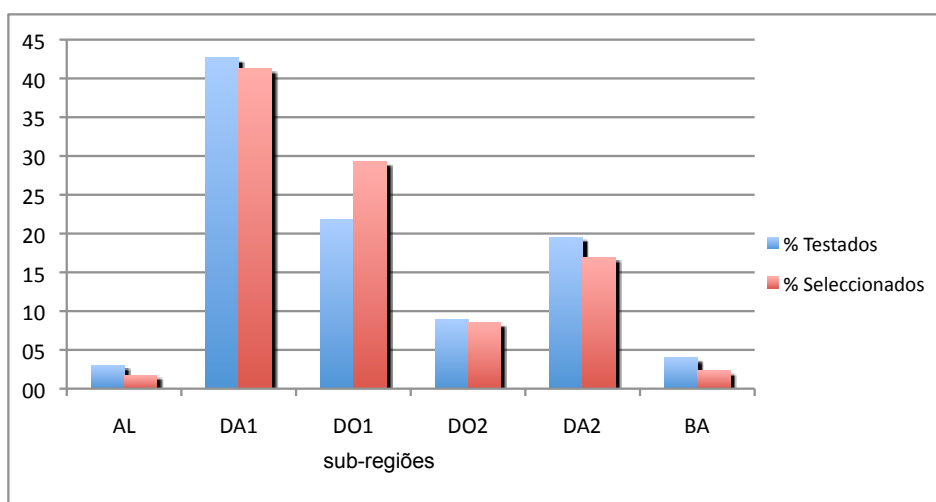


Figura 2.3 Comparação e distribuição percentual por sub-região dos 728 isolados testados e dos 342 isolados seleccionados após o ensaio 1.

Avaliada a capacidade das leveduras de crescerem em “Mosto Base” torna-se importante restringir ainda mais os critérios de aceitabilidade. **O segundo conjunto de testes** englobou os ensaios 2, 3 e 4. Nestes testou-se: i) a capacidade das leveduras crescerem a diferentes valores de pH (3,2; 3,0 e

2,7); ii) a resistência a compostos tóxicos (SO₂ e cobre); iii) a cinética de crescimento em mosto com uma concentração de açúcares elevada (glucose e frutose = 220 mg/l); e iv) a resistência ao etanol (avaliada por adição incremental de etanol durante o crescimento). Determinou-se ainda a capacidade dos isolados converterem glucose/frutose em etanol (taxa de fermentação) e o consumo de glucose e frutose ao fim de 15 dias de crescimento a 15°C. Ainda que algumas condições testadas raramente se verifiquem na prática vinícola (v.g. pH 2,7), o objectivo era seleccionar *in extremis* um grupo de leveduras capazes de fermentar num largo espectro de condições de vinificação. Na Figura 2.4 apresentam-se exemplos de curvas de crescimento obtidas por medição da absorvância a 520 nm em cada um dos meios. As curvas foram seleccionadas de modo a demonstrar a variabilidade observada no crescimento dos isolados em cada meio. Em todas as curvas foi incluída a estirpe comercial (estirpe 771), como estirpe de referencia e comparação do comportamento global. Na Tabela 2.2 apresentam-se os valores médios e as medidas de variabilidade observados para cada condição em estudo. Simultaneamente apresentam-se também os valores para a levedura 771.

Tabela 2.2 Valores médios (MED), desvio padrão (SD), coeficiente de variação (CV), valores máximos (MAX) e valores mínimos (MIN) medidos nos 342 isolados e na estirpe comercial para as 11 variáveis em estudo. Cu = cobre; EtOH= etanol e G+F = açúcares totais (glucose e frutose).

	NAUC								Concentração Final		
	"Mosto Base"	pH 3,2	pH 3,0	pH 2,7	Cu 3 mg/l	EtOH 9%	G+F 220 g/l	SO ₂ 15 mg/l	Glucose (g/l)	Frutose (g/l)	EtOH (%)
		96h								15 dias	
MED	65.7	59,6	64,6	59,1	62,1	24.6	33.5	5.1	74.8	59.4	4.1
SD	7.14	9,6	12,29	11,21	11,23	12.03	8.56	6.25	32.48	23.52	2.71
CV	10.9	16,1	19,0	19,0	18,1	48.9	25.6	122.3	43.4	39.6	65.2
Max	89.5	85,7	97,5	105,7	92,0	65.9	69.0	24.1	118.3	100.3	11.8
min	53.0	1,9	9,2	1,4	6,3	2.5	3.5	0.0	0.0	6.4	0.0
771	75.8	50,9	54,8	55,0	35,5	21.0	39.5	3.1	0.1	7.6	11.7

No que toca aos valores de pH, é notável uma brusca diminuição da NAUC da estirpe 771 quando se muda do meio "Mosto Base" para os outros meios. Considerando que o pH óptimo de crescimento da espécie *S. cerevisiae* situa-se entre 3 e 6, uma ligeira diminuição do crescimento seria expectável. No entanto, o facto da descida do pH de 3,35 ("Mosto Base") para 3,2 ter resultado na diminuição da NAUC observada é um pouco surpreendente. Considerando ainda que esta espécie está descrita como sendo resistente a baixos valores de pH, o mais natural seria notar-se uma maior diminuição dos valores NAUC no meio com pH 2,7 relativamente aos outros meios. Uma possível explicação para este fenómeno pode ter sido o facto de no início do ensaio 2 ter-se mudado para uma micropipeta multicanal. Embora os valores médios dos isolados se tenham mantido semelhantes nos diferentes valores de pH, ligeiras flutuações de volume de inóculo, causadas pela mudança de micropipeta, quando introduzidas num volume de ensaio pequeno (280 µl) podem resultar na diferença observada.



Figura 2.4 Exemplos de curvas de crescimento obtidas por determinação dos valores de absorvância a 520 nm para cada uma das condições dos ensaios 1, 2 e 3. Na curva do etanol estão marcados os pontos de adição de etanol para atingir as concentrações indicadas, relativamente ao meio base inicial (“Mosto Base”).

Referindo os valores de NAUC registados no meio com cobre, é interessante observar que a média se mantém sensivelmente a mesma que nos meios com diferentes valores de pH. Este facto pode ser uma indicação que as leveduras autóctones são resistentes a esta concentração de cobre em consequência do provável uso de antifúngicos à base de cobre nas vinhas.

Relativamente ao crescimento a crescentes concentrações de etanol é notável, tanto na Figura 2.4 como na Tabela 2.2, uma nítida diminuição dos valores médios de NAUC. Coincidente à introdução do etanol absoluto no meio (a cada 24h) pode-se observar uma diminuição da taxa de crescimento das leveduras consequente de adaptações às crescentes concentrações de etanol no meio. Como já mencionado, a principal acção inibitória do etanol centra-se na redução de influxo de açúcares através da membrana, podendo resultar numa interrupção do crescimento das leveduras. Uma vez que a introdução de etanol no meio pode retardar o início da fermentação (Ribéreau-Gayon et al 1975; 2006a), seria interessante prolongar este estudo e comparar os resultados a curto e a longo prazo.

Quanto às curvas obtidas em SO₂ foi notável uma diminuição brusca do crescimento das leveduras. Ainda que a acção antimicrobiana do SO₂ resulte numa diminuição da população total e que os efeitos sejam potenciados em inóculos na ordem dos 10⁶-10⁴ cfu/ml (Lehmann 1987 cit. <http://www.brsquared.org/wine/>), a inibição observada é excessiva. A explicação mais provável para este efeito resulta de erro experimental. Em 1951, Scardovi mostrou que algumas estirpes de *S. cerevisiae* são sensíveis a concentrações entre 0,5 e 0,9 de SO₂ molecular podendo ocorrer uma inibição total do crescimento a concentrações superiores a 1 mg/l. Considerando que a concentração de SO₂ molecular (forma activa) por dissolução do metabissulfito de potássio está dependente de inúmeros factores, principalmente do pH (Jackson 2000), admite-se a possibilidade de ter ocorrido uma sulfitação exagerada que culminou nos valores observados.

Para a determinação da capacidade fermentativa dos isolados (ensaio 4), dois factores foram tidos em conta: o factor de conversão de açúcares em etanol (rendimento da fermentação) e a capacidade dos isolados consumirem, em 15 dias, os açúcares presentes no mosto (capacidade de terminar a fermentação).

A taxa de fermentação (taxa de conversão de açúcar em etanol) é dependente da biomassa total viável e da taxa individual de consumo de açúcares em cada célula (Benda 1982). Fora os inúmeros factores ambientais que podem levar a fermentações paradas ou lentas, a capacidade de fermentar completamente os açúcares presentes no mosto é intrínseca a cada estirpe e assume uma importância extrema em regiões onde o mosto tem elevadas concentrações de açúcar (Bauer & Pretorius 2000). Se as leveduras não forem capazes de fermentar completamente os açúcares e deixarem valores residuais elevados no mosto podem estimular o crescimento de bactérias, levando a doenças do vinho e/ou vinhos com baixo valor económico (Bisson 1999). Tendo em mente que recomeçar uma fermentação quando esta se encontra parada assume complicações maiores, o ideal é que as leveduras 'starter' sejam capazes de levar a cabo fermentações completas (Cavazza et al. 2004).

A concentração dos principais açúcares fermentados no mosto, glucose e frutose, depende da maturidade das uvas e situa-se tipicamente entre 120 e 270 g/l (Benda 1982). Estas hexoses podem ocorrer em rácios variáveis mas geralmente encontram-se na proporção 1:1. Na Figura 2.5 pode-se constatar que, embora nenhum dos isolados em estudo tenha consumido completamente todos os

açúcares presentes no mosto, 31 consumiram toda a glucose. Estes dados são consistentes com os demonstrados por Berthels *et al.* (2004) uma vez que a maioria das espécies ocorrentes no mosto são glucofílicas ou seja, fermentam a glucose a uma taxa superior que a frutose.

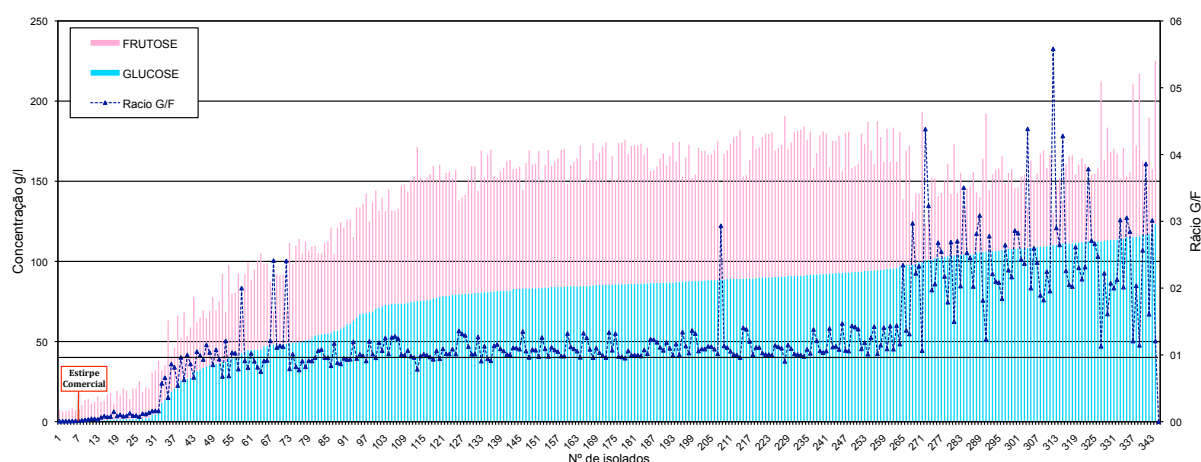


Figura 2.5 Valores residuais de glucose e frutose e respectivo rácio medidos após 15 dias de fermentação em “Mosto Base” com açúcares a 225 g/l (123 g/l de Glucose e 102 g/l de Frutose) a 15°C sem agitação.

Apesar do etanol ser um dos principais subprodutos da fermentação do mosto, constitui um dos maiores factores limitantes do crescimento das leveduras no decurso desta (Santos *et al.* 2008). A determinação da sua concentração é talvez uma das principais análises de rotina nas indústrias vinícolas actuais. A importância da concentração alcoólica no vinho deriva não só do seu impacto na qualidade e conservação do produto mas também porque determina o seu valor comercial e o tipo de impostos a que é sujeito. Como tal a sua determinação requer uma elevada precisão.

Como se pode observar na Tabela 2.2, a concentração média atingida foi de 4.1% etanol. Por observação da Figura 2.6 é notável que distribuição dos 342 isolados em termos de produção de etanol apresenta três patamares distintos: i) 10-12% etanol, onde se situa a estirpe comercial; ii) 4-9% etanol e iii) 0-4% etanol onde se situa a maioria dos isolados. Este valor reduzido é sinal que a fermentação terminou antes do tempo para muitos dos isolados. Estes resultados são consistentes com os observados para os valores residuais de açúcares uma vez que estas duas variáveis são inversamente proporcionais.

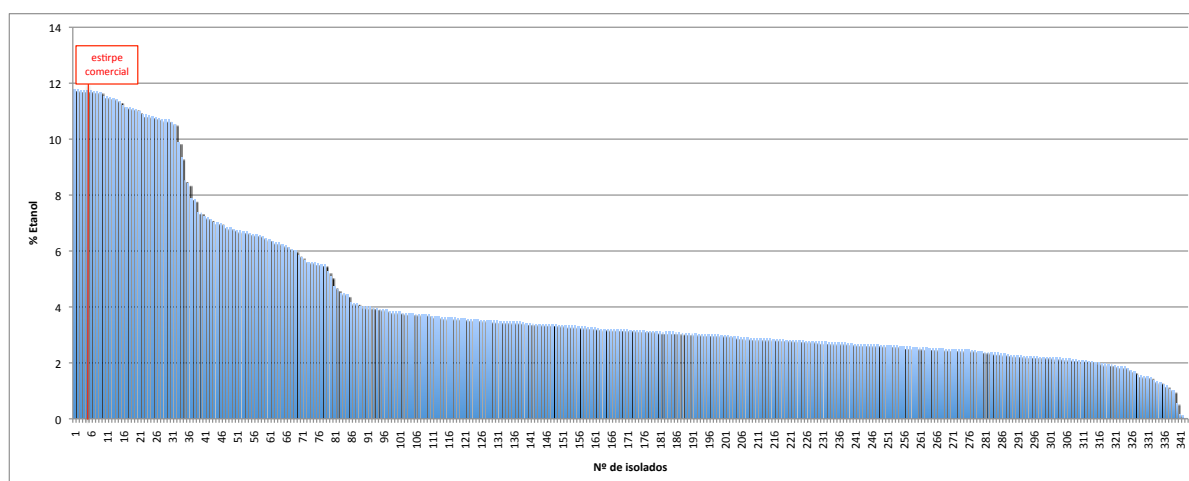


Figura 2.6 Valores de etanol medidos após 15 dias de fermentação em “Mosto Base” com açúcares a 225 g/l (123 g/l Glucose, 102 g/l Frutose) a 15°C, sem agitação.

Muitas das espécies autóctones do mosto são capazes de se desenvolver no início da fermentação podendo atingir populações de 10^6 - 10^7 cfu/ml e influenciando as características finais do vinho. À medida que a fermentação decorre e os valores de etanol vão aumentando, estas espécies vão sendo incapazes de fermentar açúcares e a fermentação pára (Fleet *et al.* 1984). O resultado é uma elevada concentração de açúcares residuais e baixo teor alcoólico.

Dos 342 isolados em estudo, 31 atingiram valores de etanol acima dos 10% (ver Figura 2.6) e desses, 2 pertencem a espécies não-*Saccharomyces* e 29 pertencem à espécie *S. cerevisiae*. O facto de a maioria dos isolados deste grupo pertencerem à espécie *S. cerevisiae* vem mais uma vez confirmar a elevada tolerância desta espécie ao etanol e justificar a escolha de estirpes desta espécie como fermentadoras de eleição na produção de vinho.

Devido ao elevado número e variabilidade de dados obtidos, optou-se por uma abordagem de análise multivariada dos valores obtidos nos ensaios 1, 2, 3 e 4. A análise de componentes principais (PCA) envolve uma série de transformações matemáticas de forma a poder agrupar um número elevado de variáveis potencialmente correlacionáveis em números discretos de variáveis não correlacionadas denominadas componentes principais. O seu objectivo consiste em reduzir o número de dimensões dos dados ao mesmo tempo que retém o máximo da variabilidade original possível permitindo uma representação fiável da matriz de dados original. Desta forma os valores obtidos para os 342 isolados e a estirpe comercial nas 11 variáveis estudadas³ foram agrupados numa matriz de 343 linhas (isolados) e 11 colunas (variáveis). A esta matriz de dados aplicou-se uma análise em componentes principais e os 3 primeiros factores, correspondendo a 63% da variância inicial, foram usados para discriminação dos isolados. Na Figura 2.7 apresenta-se uma representação tridimensional da distribuição dos isolados no espaço das 3 primeiras componentes principais.

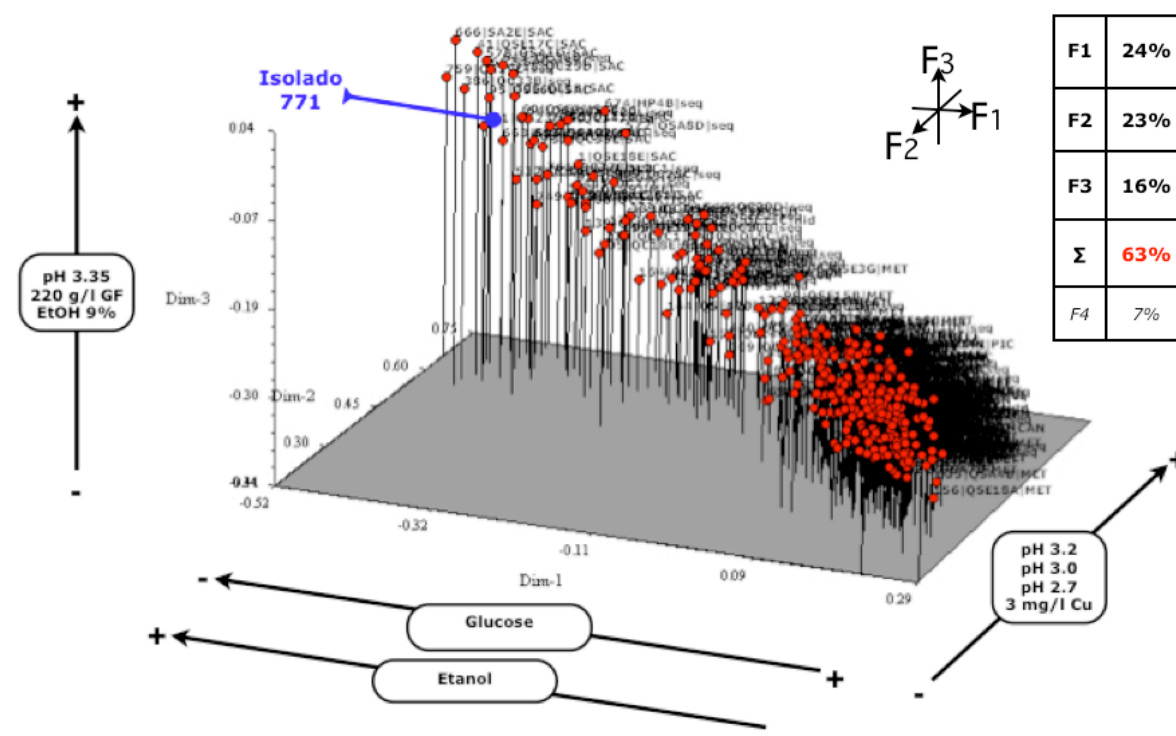


Figura 2.7 Representação tridimensional (3D) da projecção dos 342 isolados e da estirpe comercial 771 obtida por análise PCA das 11 variáveis determinadas nos ensaios 1, 2, 3 e 4. Para F1, F2 e F3 indicam-se as principais variáveis explicativas dos eixos e a respectiva variância. O eixo F4, não representado, tem como principal variável explicativa $SO_2 = 15$ mg/l.

3) "Mosto Base" ; pH 3,2 ; pH 3,0 ; pH 2,7 ; Cu = 3 mg/l ; SO_2 = 15 mg/l ; resistência a etanol; açúcares = 220 g/l ; glucose residual; frutose residual ; etanol formado (ver Tabela 2.2). 27

O eixo F1 corresponde às variáveis glucose residual e etanol produzido ao fim de 15 dias (ensaio 4). Uma vez que a concentração de açúcares residuais e a produção de etanol são variáveis inversamente proporcionais (maior consumo de açúcares, maior produção de etanol) quanto mais positivo for o valor do isolado ao longo do eixo F1 maior a concentração de glucose residual e por consequência, menor a concentração de etanol.

Sendo assim, as estirpes mais desejáveis são as que apresentam valores mais negativos ao longo deste eixo. Relativamente aos valores de frutose residual, durante o cálculo das componentes principais no método PCA, observou-se que esta variável apresentava um coeficiente de correlação com o eixo F1 igual ao da variável glucose residual. Embora o coeficiente de correlação calculado entre as duas variáveis (glucose residual e frutose residual) tenha sido baixo ($r=0,57$), constata-se na Figura 2.6 que, tirando algumas excepções, os isolados que consomem mais glucose são os que consomem também mais frutose. Sendo assim, considerou-se esta uma variável não discriminativa e não se incluiu no gráfico. Os eixos F2 e F3 correspondem aos valores NAUC obtidos nos ensaios 2 e 3, respectivamente, e quanto mais elevado o valor ao longo destes eixos mais desejáveis são as estirpes. Como se pode constatar, a distribuição dos isolados no espaço de caracteres representado por estes 3 eixos apresenta uma dispersão gradual que não permite uma fácil discriminação de grupos definidos. Ainda assim é possível observar um aglomerado mais concentrado de isolados nas coordenadas diametralmente opostas às da estirpe comercial. Estes isolados, pela sua posição no gráfico, revelam-se pouco adequados para serem usados como estirpes 'starter' e como tal, de pouco interesse para prossecução dos estudos. Por outro lado, os isolados localizados nas coordenadas geográficas mais próximas da estirpe comercial apresentam as características mais desejáveis.

O eixo F4, representativo do crescimento em SO_2 , contém apenas 7% da variabilidade original e apresenta pouco poder discriminatório não sendo assim representado.

Devido à dificuldade da definição precisa do grupo de estirpes desejadas, optou-se por representar a matriz de dados 343x11 num dendrograma ($p = 0,87$; dados não apresentados). A um nível de corte correspondente a 91% de semelhança o 'cluster' onde se encontra a levedura 771 é composto por mais 33 isolados. Destes, 29 pertenciam à espécie *S. cerevisiae* (SAC1 a SAC29) e 4 a outras espécies (NSAC1 a NSAC4).

No ensaio 5, foi-se testar a resistência das 33 leveduras seleccionadas e da estirpe comercial a baixas temperaturas, medindo a sua cinética de crescimento a 8°C. As temperaturas de fermentação situam-se normalmente entre os 13/15°C e os 20°C. Temperaturas abaixo dos 10°C são já consideradas muito baixas uma vez que metabolismo das leveduras está drasticamente reduzido dificultando em muito o desenvolvimento destas e a fermentação. Contudo, o objectivo deste estudo era testar a variação de resposta dos isolados seleccionados após o ensaio 4 perante temperaturas mais extremas.

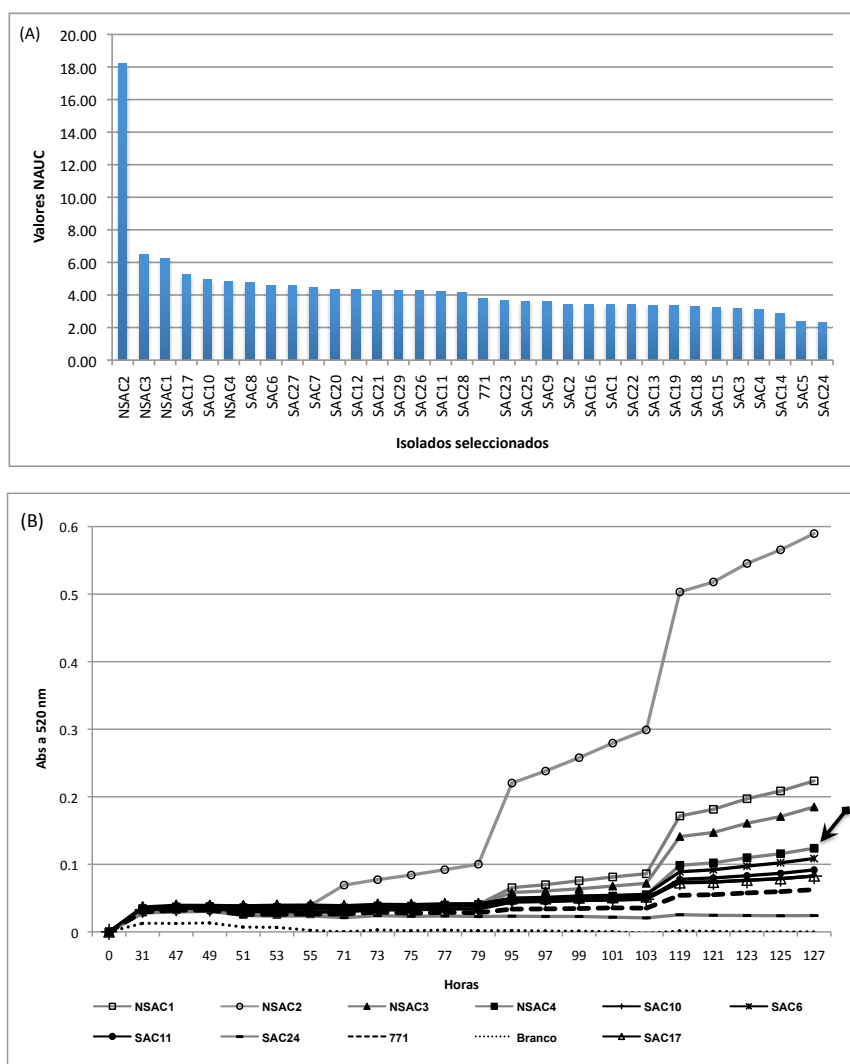


Figura 2.8 (A) Valores NAUC calculados a partir das curvas de crescimento a 8°C dos isolados seleccionados após o ensaio 4 e da estirpe comercial **(B)** Exemplos das curvas de crescimento a 8°C. Os isolados não-*Saccharomyces* têm as curvas a cinzento. A seta está a indicar o isolado NSAC4.

Como se pode observar na Figura 2.8, o crescimento das leveduras foi fortemente restringido pelas baixas temperaturas e, mesmo o aumento do tempo de ensaio para 127 horas, não foi suficiente para que as leveduras conseguissem atingir os valores de NAUC observados nos ensaios anteriores (Tabela 2.2).

Ainda assim discriminam-se algumas diferenças de crescimento entre as espécies. Dentre os isolados, as leveduras não-*Saccharomyces* (NSAC1 a NSAC 4) apresentaram os valores de NAUC mais elevados (figura 2.8(A)). Para a levedura NSAC4, ainda que esta exiba um valor de NAUC ligeiramente inferior aos valores de NAUC das estirpes SAC17 e SAC10, é possível observar no gráfico da Figura 2.8(B) que nas últimas horas do ensaio a sua curva de crescimento começa a diferenciar-se das restantes estirpes de *S.cerevisiae* (indicado com uma seta). Estes resultados são concordantes com estudos anteriores (Charoenchai et al. 1998), nos quais muitas espécies não-*Saccharomyces* apresentam uma elevada tolerância a baixas temperaturas chegando muitas vezes a suplantar *S.cerevisiae* em fermentações espontâneas. A levedura comercial neste ensaio apresenta o comportamento típico das outras estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Resta ainda mencionar que as curvas de crescimento no ensaio 5 apresentam um perfil atípico das curvas obtidas em todos os ensaios desta fase. Em todas as curvas são observáveis períodos (16h) em que taxa de crescimento é mais acentuada seguidos de patamares (8h) com reduzida duplicação celular. Estes fenómenos são coincidentes com o período das leituras de absorvância (8h) e o período 'overnight' (16h). Uma das limitações da metodologia empregue na determinação do crescimento das leveduras consistiu na impossibilidade de manter a temperatura de incubação durante a leitura. A cada ponto de leitura, as microplacas foram retiradas da estufa refrigerada a 8°C e o crescimento foi avaliado por leituras de absorvância à temperatura ambiente. Embora o tempo de leitura tenha sido bastante reduzido (3 a 5 min), estas bruscas variações de temperatura podem ter surtido efeitos restritivos no crescimento dos isolados resultando nos padrões de crescimento observados.

2.4 Conclusões

A realização que algumas espécies de leveduras, para além das pertencentes ao género *Saccharomyces*, são ecológica e metabolicamente importantes na fermentação do vinho permitiu o estabelecimento de novas rotas na procura de estirpes 'starter'. O potencial de usá-las como estirpes "starter" individuais no desenvolvimento de novos estilos de bebidas fermentadas já foi diversas vezes mencionado mas ainda pouco explorado. O enviesamento corrente na predilecção da espécie *Saccharomyces cerevisiae* continua ainda hoje a exercer uma pressão limitante na exploração do uso de outras espécies (Fleet 2008).

Um conjunto de 728 isolados seleccionados na Fase I foi submetido a 5 ensaios de forma a estudar a resposta individual de cada isolado a cada um dos 12 parâmetros propostos. Todos os ensaios foram efectuados em mosto estéril permitindo assim avaliar cada levedura sem ter em conta efeitos de competitividade. Por análise das respostas de cada isolado a cada condição e por comparação com uma estirpe tipicamente usada em vinificações (isolado 771) seleccionaram-se 33 potenciais leveduras 'starter'. Destas, a maioria pertence à espécie *S.cerevisiae*, mais uma vez confirmando a razão para esta ser a espécie de eleição na enologia. Todavia, a selecção de 4 isolados pertencentes a espécies não-*Saccharomyces* vem reforçar a importância da implementação de métodos não discriminantes de espécie na escolha de estirpes 'starter'.

Alguns dos problemas observados nesta fase podem ser explicados pela metodologia empregue. Ainda que tenham sido tomadas precauções para minimizar todo o 'stress' nas leveduras para além do induzido pela condição em estudo, a leitura entre o período das 9h e as 17h resulta num prolongado período 'overnight' (16h) em que não se tiram pontos de leitura. Se considerarmos a drástica mudança entre o período 'overnight' (sem agitação e a temperatura constante) para o período de leitura (agitação de 2 em 2 horas, leituras à temperatura ambiente) pode-se inferir que este ritmo induz um certo 'stress' exógeno adicional. No entanto, a inclusão de duplicados em cada ensaio e a segurança que as condições, ainda que não ideais, se mantiveram iguais para todos os isolados, permitem manter, do ponto de vista de selecção por comparação, a validade do estudo.

Fase III - Métodos moleculares de diferenciação

Objectivos: Analisar métodos de PCR na sua capacidade de diferenciação dos 33 isolados seleccionados na Fase II. Pesquisa de potenciais marcadores moleculares para rastreio rápido e inequívoco dos isolados.

3.1 Introdução

As técnicas baseadas em características fenotípicas têm sido, tradicionalmente, as metodologias padrão de identificação e caracterização de microrganismos na indústria enológica. Métodos de determinação das propriedades bioquímicas fundamentais das leveduras viáveis incluem a utilização de diferentes fontes de carbono e azoto, síntese de metabolitos específicos e activação de determinadas vias metabólicas (Barnett *et al.* 2000). Porém, apesar de fornecerem uma vasta quantidade de dados, estas técnicas exigem um investimento de tempo significativo chegando a demorar dias ou mesmo semanas. Este dispêndio de tempo pode muitas vezes significar que informações importantes e essenciais ao correcto decurso da fermentação chegam demasiado tarde para permitir acções preventivas.

Nos últimos 20 anos, os significativos avanços na biologia molecular têm permitido uma correcta identificação e caracterização de microrganismos requerendo apenas uma fracção de tempo que demoram as técnicas de caracterização fenotípica (Pretorius *et al.* 1991).

A inoculação de estirpes puras em mosto com fim a obter sistematicamente um determinado tipo de vinho é uma prática comum desde os anos 70. Nos tempos que correm, a maioria das empresas produtoras de vinho utilizam de forma continuada leveduras ‘starter’ comerciais, de modo a garantir um produto de qualidade consistente e que, acima de tudo, assegure o nome da marca e a fidelidade do consumidor.

A grande maioria das leveduras comerciais actuais pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae* e como tal não são facilmente diferenciáveis pelo uso de critérios clássicos. Sendo assim, o recurso a técnicas que permitem uma correcta diferenciação entre as estirpes inoculadas e a microbiota natural presente no mosto adquire uma importância extrema e é visto com grande interesse por parte dos grandes produtores. A necessidade de um controlo restrito da qualidade durante todo o processo e a garantia que a estirpe inoculada é a efectivamente responsável pela fermentação, levaram a um acelerado desenvolvimento das técnicas de análise molecular.

Entre os inúmeros métodos desenvolvidos destacam-se: i) restrição de DNA genómico (Guillámon *et al.* 1998) e mitocondrial (López *et al.* 2001; Querol *et al.* 1992); ii) comparação de perfis de DNA cromossómico (cariotipagem; Briones *et al.* 1996; Charpentier *et al.* 2009); iii) ‘Amplified Fragment Length Polymorphism’ (AFLP); iv) ‘PCR-fingerprinting’ [‘Random Amplified Polymorphic DNA’ (RAPD); MSP-PCR e amplificação e caracterização de elementos δ (delta)] (Beh *et al.* 2006); e v) análise de microsátélites.

Os microsátélites ou sequências simples repetidas (SSR) consistem em repetições em tandem de pequenas sequências de DNA (1 a 10 nucleótidos) dispersas pelo genoma. São frequentemente encontradas nos genomas eucarióticos e apresentam diferenças no número de repetições das suas sequências, resultantes de erros durante a replicação do DNA. Ao apresentarem um polimorfismo hipervariável entre indivíduos da mesma espécie são actualmente utilizados em testes de paternidade, medicina forense e na diferenciação de estirpes patogénicas. Em leveduras, e mais

especificamente na espécie *S. cerevisiae*, a dispersão ubíqua dos *loci* de microsatélites pelos 16 cromossomas e pelo DNA mitocondrial permite, pela sua análise, uma diferenciação ao nível de estirpe (González Técher *et al.* 2001; Pérez *et al.* 2001).

De todas estas técnicas, os métodos baseados na técnica de PCR primam pela elevada rapidez e facilidade de aplicação. Tornam-se assim os métodos ideais na identificação/diferenciação de estirpes ao longo de todo o processo de fermentação.

Os métodos baseados em MSP-PCR, pela homologia dos 'primers' com sequências micro ou minisatélites dispersas pelo genoma eucariótico permitem, a obtenção de perfis de bandas altamente polimórficas e facilmente visualizáveis por electroforese em gel de agarose. Ao contrário dos métodos RAPD (polimorfismos de amplificação de sequências aleatórias), cuja baixa temperatura de emparelhamento dos 'primers' resulta em perfis com um reduzido nível de reprodutibilidade, os métodos de MSP-PCR apresentam uma elevada fiabilidade e consistência nos resultados (Soll 2000). Os 'primers' csM13 e (GTG)₅ foram já previamente descritos como tendo um elevado poder discriminante na tipificação de leveduras, permitindo uma diferenciação tanto a nível específico como infra-específico (Torriani *et al.* 1999; Gaitanis *et al.* 2009; Baleiras Couto *et al.* 1996).

Uma vez que o grupo seleccionado para esta fase é composto maioritariamente por *S. cerevisiae*, optou-se por estudar também os pares de 'primers' δ1/δ2 (Ness *et al.* 1993) e δ12/δ21 (Legras *et al.* 2003). Estes 'primers' baseiam-se na existência de sequências repetidas de DNA associadas ao retrotransposão Ty1 de *S. cerevisiae*. O número e localização destas sequências conferem uma certa variabilidade intraespecífica que permite a identificação e diferenciação de estirpes (Lavallée *et al.* 1994; Carreto *et al.* 2008). Os perfis gerados pela amplificação das sequências δ podem ser aplicados facilmente ao processo industrial, uma vez que a sua elevada rapidez, relativa acuidade e enorme facilidade de aplicação permitem acompanhar e controlar todo o processo fermentativo (Schuller *et al.* 2004; Lopes *et al.* 2002).

3.2 Material e métodos

3.2.1 'Primers' e condições de amplificação

Usando o DNA extraído na Fase I, os isolados da colecção foram analisados por MSP-PCR usando como 'primers' únicos os oligonucleótidos homólogos de microsatélites (GTG)₅ e minisatélites [csM13 (5'- GAGGGTGGCGGTTCT -3'')]. As condições utilizadas foram as mesmas que as definidas na Fase I.

Para o estudo dos pares de 'primers' δ1 (5'-CAAAATTCACCTATATCT-3'), δ2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAAC-3') e δ12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'), δ21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'); fizeram-se reacções de 25 µl contendo 1X tampão de reacção, 1 U de Taq DNA polimerase, 0,4 mM de cada deoxinucleósido trifosfato, 3 mM MgCl₂, 40 pmol de cada 'primer' e 1 µl de DNA diluído 1/10 da extracção inicial. Todos os reagentes provieram da Invitrogen (Paisley, UK).

As condições de amplificação no termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Alemanha) foram as usadas por Schuller *et al.* (2004) para o par de 'primers' δ1/δ2 e as usadas por Legras *et al.* (2003) para o par de 'primers' δ12/δ21.

Os produtos de amplificação com os 'primers' csM13 e (GTG)₅ foram separados por electroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão TBE 0,5 X (Invitrogen, Paisley, UK) a 80 V, durante 3h.

Após coloração com brometo de etídio, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema Kodak 1D (Kodak, Rochester, NY, USA).

Os produtos de amplificação das sequências δ foram separados por electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5 X (Invitrogen, Paisley, UK) a 90 V durante 3h. Após coloração com brometo de etídio, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema Kodak 1D (Kodak, Rochester, NY, USA).

3.2.2 Análise dos perfis

As imagens adquiridas foram tratadas com o software Bionumerics® versão 4.61 (Applied Maths, Kortijk, Bélgica). Após normalização das imagens correspondentes a cada perfil de 'fingerprinting', foram obtidos os respectivos perfis densitométricos e aplicado o coeficiente de correlação de Pearson. A análise numérica dos perfis de 'fingerprinting' e a associação entre as estirpes foram determinadas por aglomeração hierárquica utilizando a média aritmética não ponderada (UPGMA).

A reprodutibilidade obtida para os diferentes métodos foi determinada através do cálculo da média dos índices de similaridade para 10% das estirpes, seleccionadas aleatoriamente e respectivas réplicas.

3.3 Resultados e discussão

Tal como descrito na introdução, testaram-se os 'primers' (GTG)₅ e csM13 na sua capacidade de diferenciação dos 33 isolados seleccionados na Fase II.

Após amplificação com o 'primer' csM13, foram obtidos fragmentos com massas moleculares entre 300 pares de base (pb) e 4000 pb, estando a maioria dos fragmentos situada entre 500 e 1650 pb. Por observação da Figura 3.1 é notável que, embora o uso deste 'primer' resulte em perfis complexos, a maioria dos isolados apresenta um perfil muito semelhante. De facto, excluindo os isolados não-*Saccharomyces* (NSAC1 a NSAC4), as diferenças nos perfis são dificilmente discerníveis.

Uma análise dos perfis com recurso ao software Bionumerics® permitiu a construção de um dendrograma com maior poder discriminante que o possível por comparação visual dos perfis. Considerando um nível de corte de 80%, é possível observar na Figura 3.2 a existência de 9 'clusters' bem definidos. Os 'clusters' V, VI, VIII e IX são constituídos pelos isolados pertencentes a espécies não-*Saccharomyces*. A sua clara separação dos restantes isolados a um nível de semelhança de 60,8% vem reforçar, o já documentado poder desta metodologia na diferenciação inter-específica (Loureiro 2000, Laitila *et al.* 2006). De notar também é a diferenciação do isolado SAC26 das restantes *S. cerevisiae*. Um estudo mais cuidadoso da Figura 3.1 permite observar que as principais diferenças do perfil deste isolado relativamente aos outros residem sobretudo na ausência de bandas moderadamente ténues de peso molecular compreendido entre 1650 e 3000 pb.

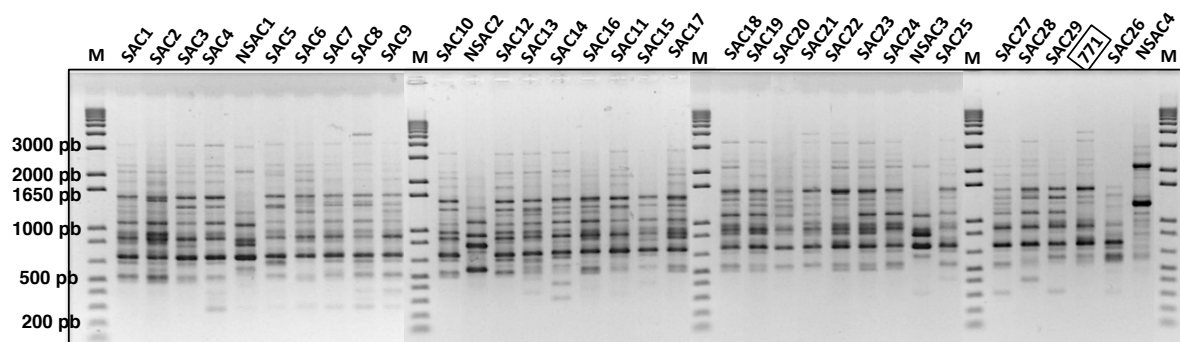


Figura 3.1 Perfis de MSP-PCR dos 33 isolados seleccionados no final da Fase II, obtidos com o 'primer' csM13. M - Marcador de massas moleculares 1 kb plus (Invitrogen)

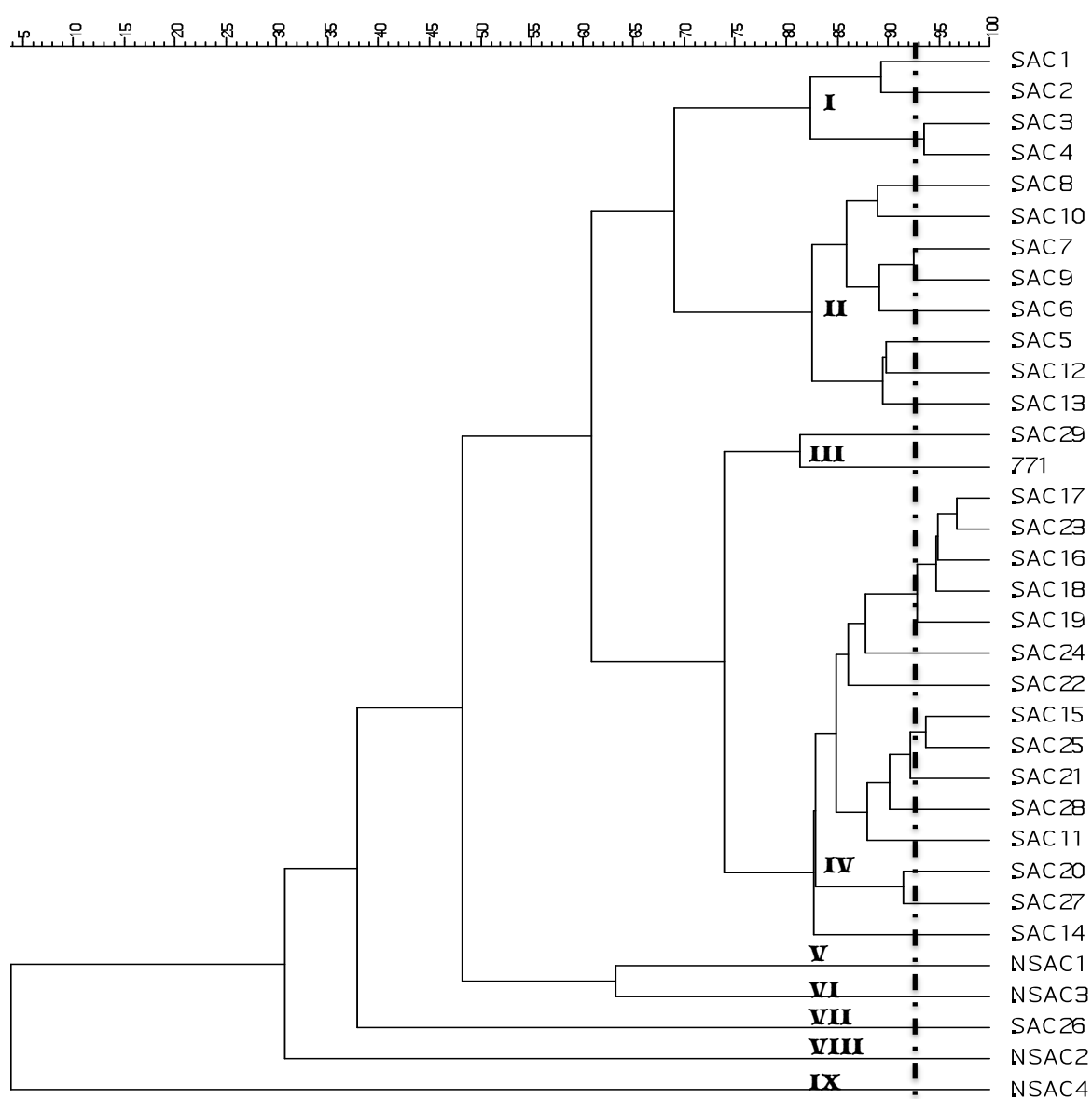


Figura 3.2 Dendrograma dos perfis dos 33 isolados seleccionados no final da fase II, obtidos por MSP-PCR com o 'primer' csM13. A linha tracejada representa o valor médio de reprodutibilidade (92,97%) determinado para 10% dos isolados.

(Coeficiente de correlação de Pearson e método de aglomeração UPGMA; $p = 0,88$)

Se estas diferenças se devem a problemas de amplificação ou se são características deste isolado é algo a esclarecer futuramente. Estabelecendo um nível de corte de 92.97%, correspondente à reprodutibilidade média calculada para 10% dos isolados em estudo, considera-se que os isolados dos grupos SAC3/SAC4, SAC17/SAC23/SAC16/SAC18 e SAC15/SAC25 não podem ser diferenciados (em cada grupo), com recurso a esta técnica. Disto resultam então 29 perfis diferentes para um total de 34 isolados.

Ainda que os 'clusters' estabelecidos permitam uma certa diferenciação intra-específica dos isolados, a elevada semelhança visual dos perfis obtidos torna quase impossível a escolha de marcadores moleculares que permitam uma rápida e correcta rastreabilidade dos isolados durante o processo fermentativo. Se por um lado, o recurso ao método de correlação de Pearson aumenta significativamente o impacto da intensidade das bandas na determinação de índices de semelhança, conferindo uma importância acrescida às bandas ténues, por outro, a escolha manual das bandas e o emprego de outros índices de semelhança e/ou diferenciação não são opções viáveis. De facto a intensidade de bandas é um dos factores determinantes do poder desta técnica e a subjectividade na escolha manual das bandas reduziria em muito a sua reprodutibilidade. Sendo assim, e tendo em conta o objectivo inicialmente proposto para esta fase, considera-se que, ao contrário do constatado por Lieckfeldt *et al.* (1993), o 'PCR-fingerprinting' com recurso ao 'primer' csM13 não apresenta a resolução adequada no que toca à diferenciação infra-específica das estirpes de *S. cerevisiae* em estudo.

Quanto à diferenciação por recurso ao 'primer' (GTG)₅, como se pode observar na Figura 3.3, e previamente constatado por Baleiras Couto *et al.* (1996), este 'primer' não gerou perfis com variabilidade suficiente para permitir uma diferenciação a nível das estirpes de *S. cerevisiae*. Por observação directa do gel e comparação dos perfis obtidos, são discerníveis 8 perfis diferentes, dos quais 4 pertencem aos isolados não-*Saccharomyces*. Tal como com o 'primer' csM13, e como já previamente descrito (Capece *et al.* 2003; Tofalo *et al.* 2010; Capece *et al.* 2010), as estirpes não-*Saccharomyces* são facilmente distinguíveis, atestando o poder de diferenciação inter-específico destas técnicas de 'PCR-fingerprinting'. No entanto, nenhum dos 'primers' permitiu uma fácil, inequívoca e correcta diferenciação dos isolados de *S. cerevisiae*.

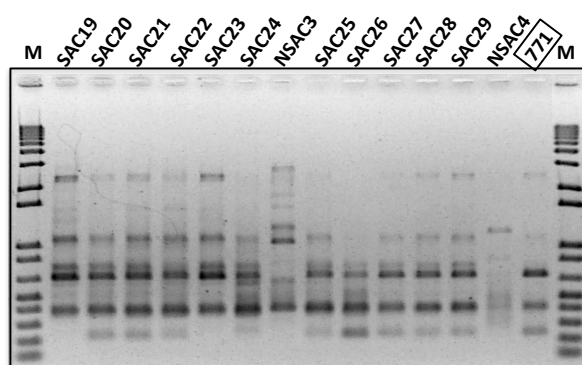


Figura 3.3 Exemplos dos perfis dos isolados seleccionados na Fase II obtidos por MSP-PCR usando o 'primer' (GTG)₅. M - marcador de massas moleculares 1kb plus (Invitrogen)

Considerando que o recurso aos 'primers' csM13 e (GTG)₅ permitiu diferenciar facilmente os isolados não-*Saccharomyces*, optou-se por estudar o poder discriminativo dos pares de 'primers' $\delta 1/\delta 2$ e $\delta 12/\delta 21$ na diferenciação das 30 estirpes *S. cerevisiae* seleccionadas.

No que toca ao par de 'primers' $\delta 1/\delta 2$ os perfis obtidos e apresentados na Figura 3.4 evidenciam 10 perfis distintos, constituídos por 2 a 5 bandas e a maioria evidenciando 3 bandas com massas moleculares de aproximadamente 2000, 1000 e 750 pb. A estirpe comercial 771 é claramente distinta dos outros isolados.

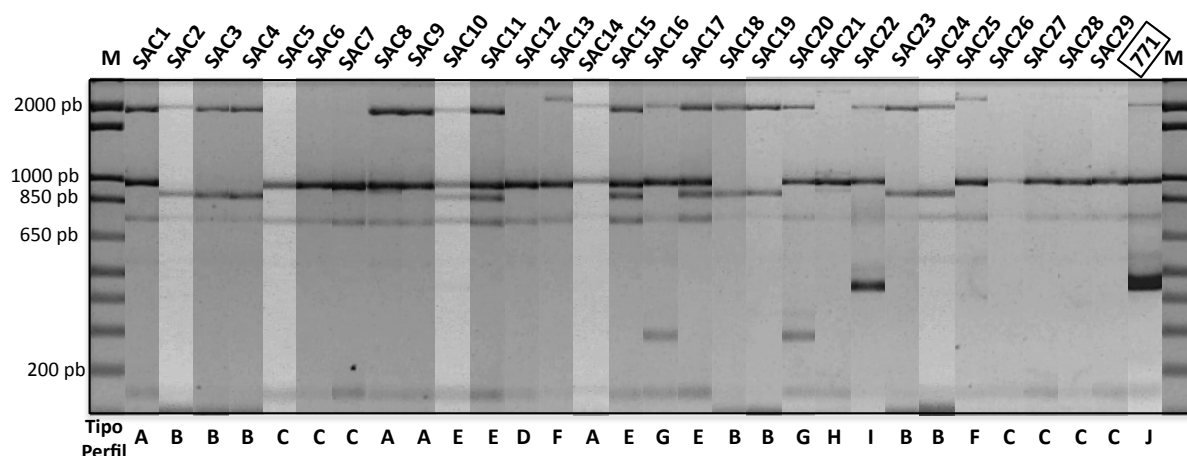


Figura 3.4 Perfis observados para os 30 isolados de *S. cerevisiae* após amplificação com os 'primers' $\delta 1$ e $\delta 2$. Os perfis foram obtidos por importação das imagens dos geis para o software Bionumerics®, tratamento digital e normalização. M - marcador de massas moleculares 1 kb plus (Invitrogen)

Tal como previamente constatado (Schuller *et al.* 2004; Lopes *et al.* 2002) este par de 'primers' gera perfis com poucas bandas resultando num número restrito de perfis diferentes. Ainda assim, os perfis são suficientemente distintos de forma a permitirem uma rápida, ainda que limitada, diferenciação dos isolados por observação directa dos geis,

Quanto ao par de 'primers' $\delta 12/\delta 21$, os perfis apresentados são constituídos por um número superior de bandas resultando num maior polimorfismo que os 'primers' $\delta 1/\delta 2$. Como se pode constatar na Figura 3.5, foram visualmente discriminados 15 perfis distintos (Perfis A a O) constituídos por bandas de massa molecular compreendida entre 150 e 1650 pb e com o grosso das bandas inferior a 1000 pb. Ao contrário dos resultados obtidos com o 'primer' csM13, estes perfis são facilmente discrimináveis por observação directa. No entanto, a relativamente baixa temperatura de emparelhamento (46 °C) pode resultar numa formação variável de bandas muito ténues de difícil observação e que podem complicar a identificação de padrões idênticos. Um forte contratempo encontrado no uso destes 'primers' centra-se na baixa intensidade global dos perfis gerados. A fraca amplificação das bandas obrigou ao emprego de geis com uma espessura mais fina, a aplicação maior volume de amostra e a cuidados redobrados durante coloração e digitalização dos geis por fotografia.

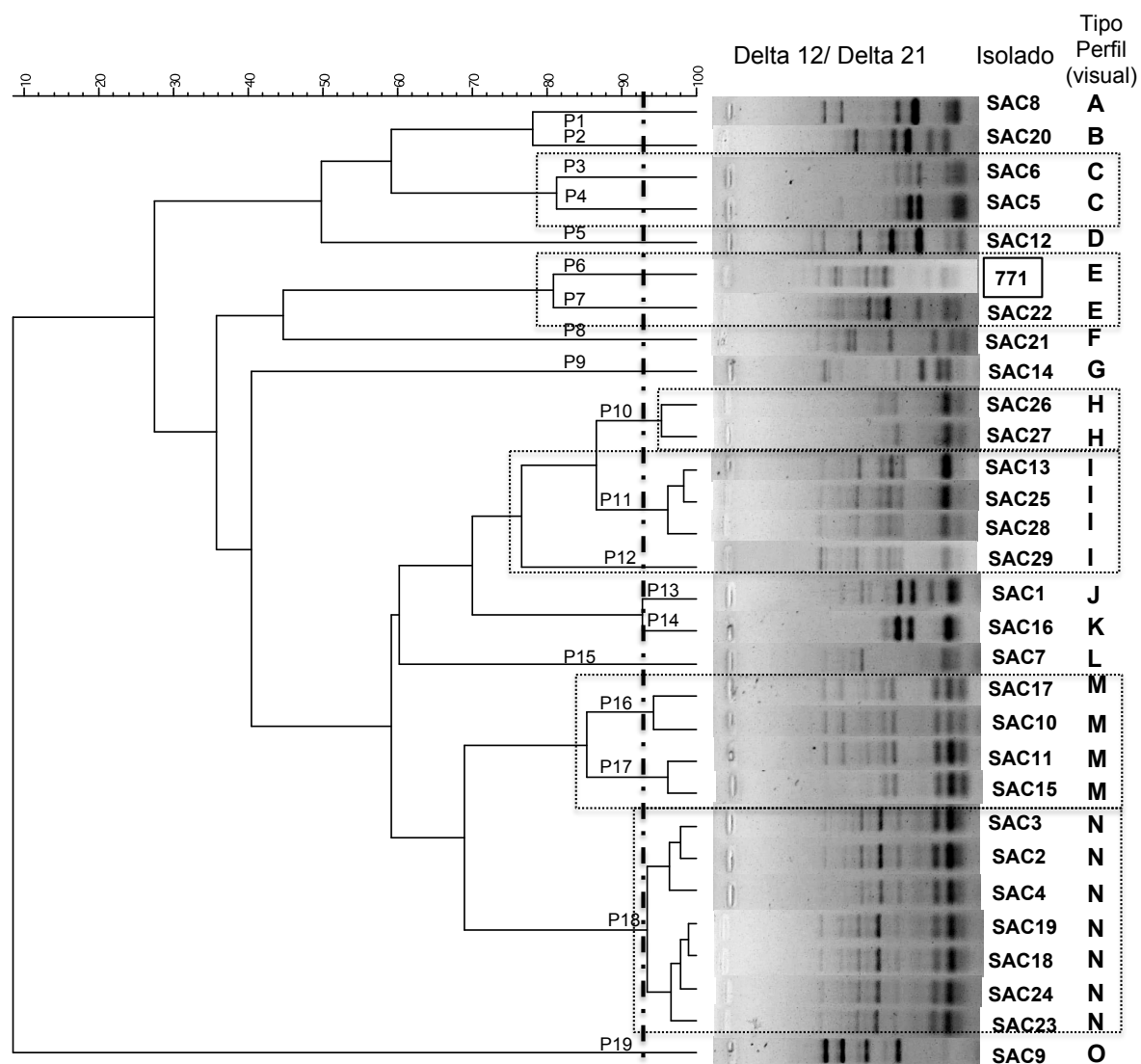


Figura 3.5 Dendrograma representativo dos 29 isolados de *S.cerevisiae* seleccionados na Fase II e da estirpe comercial, baseado nos perfis obtidos com os 'primers' $\delta 12$ e $\delta 21$. A linha tracejada representa o valor médio de reprodutibilidade (92,96%) determinado para 10% de réplicas. Estão indicados os diferentes perfis determinados no dendrograma (perfis P1 a P19) e por observação directa dos geis (perfis A a O). (Coeficiente de correlação de Pearson e método de aglomeração UPGMA, $\rho = 0,9$)

Ainda assim, limitações na digitalização dos geis resultaram na perda de bandas ténues visíveis por observação directa do gel, contribuindo para uma alterada variabilidade dos perfis e uma maior diferenciação que a correspondente à realidade. Por análise dos perfis obtidos com o software Bionumerics® e estabelecendo um nível de corte de 92.96%, correspondente à reprodutibilidade média calculada para 10% dos isolados em estudo, obtém-se um total de 19 perfis diferentes (perfis P1 a P19; Figura 3.5), mais 4 que os determinados por observação directa (perfis A a O). A análise da Figura 3.5 revela também que esta diferenciação resulta sobretudo de diferenças de intensidade das bandas dos perfis, o que é explicável tendo em conta que a medida de associação usada (coeficiente de correlação de Pearson) integra a análise densitométrica do perfil.

3.4 Conclusões

Nesta fase, 4 conjuntos de 'primers' foram testados na sua capacidade de diferenciação das 33 leveduras seleccionadas no final da Fase II.

Os isolados não-*Saccharomyces* foram facilmente diferenciados por MSP-PCR tanto com o 'primer' csM13 como com (GTG)₅.

No que respeita à diferenciação dos isolados pertencentes à espécie *S. cerevisiae* os resultados variaram muito com o tipo de 'primer' usado. Sumarizados na Tabela 3.1 encontram-se os níveis de diferenciação obtidos com cada técnica para os 30 isolados de *S. cerevisiae*.

Tabela 3.1 Sumário dos resultados obtidos para os métodos usados na diferenciação das estirpes *S. cerevisiae* da Fase III. Para cada método atribuiu-se uma letra diferente a cada tipo distinto de padrão. A cor estão demarcados os isolados não diferenciados no somatório total dos métodos usados..

Isolado	csM13	(GTG) ₅	δ1/δ2	δ12/δ21 (análise visual)	δ12/δ21 (dendrograma)	Resultado final
SAC1	A	A	A	J	M	AAAJM
SAC2	B	B	B	N	R	BBBNR
SAC3	C	A	B	N	R	CABNR
SAC4	C	A	B	N	R	CABNR
SAC5	I	B	C	C	C	IBCCC
SAC6	H	C	C	C	D	HCCCD
SAC7	F	C	C	L	O	FCCLO
SAC8	D	A	A	A	A	DAAAA
SAC9	G	C	A	O	S	GCAOS
SAC10	E	A	E	M	P	EAEMP
SAC11	U	A	E	M	Q	UAEMQ
SAC12	J	A	D	D	E	JADDE
SAC13	K	A	F	I	K	KAFIK
SAC14	X	A	A	G	I	XAAGI
SAC15	R	A	E	M	Q	RAEMQ
SAC16	N	A	G	K	N	NAGKN
SAC17	N	A	E	M	P	NAEMP
SAC18	N	A	B	N	R	NABNR
SAC19	O	A	B	N	R	OABNR
SAC20	V	A	G	B	B	VAGBB
SAC21	S	A	H	F	H	SAHFH
SAC22	Q	A	I	E	G	QAIEG
SAC23	N	A	B	N	R	NABNR
SAC24	P	B	B	N	R	PBBNR
SAC25	R	A	F	I	K	RAFIK
SAC26	Y	A	C	H	J	ZACHJ
SAC27	W	A	C	H	J	WACHJ
SAC28	T	A	C	I	K	TACIK
SAC29	L	A	C	I	L	LACIL
771	M	D	J	E	F	MDJEF
Total de perfis	25	4	10	15	19	28

Como se pode constatar a técnica que apresenta um maior poder discriminante é o MSP-PCR com o 'primer' csM13 permitindo diferenciar 25 perfis diferentes.

Quanto ao 'primer' (GTG)₅, ainda que este apresente um elevado poder de diferenciação inter-específico, a sua resolução ao nível destas estirpes revelou-se muito fraca permitindo diferenciar apenas 4 perfis.

Para os pares de 'primers' $\delta 1/\delta 2$ e $\delta 12/\delta 21$, os resultados observados são consistentes com estudos anteriores (Schuller *et al.* 2004; Pramateftaki *et al.* 2000) e, apesar de gerarem um número de perfis diferentes inferior ao 'MSP-PCR fingerprinting' com 'primer' csM13, os perfis são bem visíveis e facilmente discerníveis. Os 'primers' $\delta 12/\delta 21$ geraram um maior número de bandas, permitindo a obtenção de perfis mais complexos que os gerados pelos 'primers' $\delta 1/\delta 2$. Ainda assim, ao contrário do par de 'primers' $\delta 12/\delta 21$, o par de 'primers' $\delta 1/\delta 2$ permitiu uma diferenciação entre as estirpes SAC22 e 771 e a divisão do grupo de estirpes SAC13/SAC25/SAC28/SAC29 (perfil I na análise visual dos perfis $\delta 12/\delta 21$) em dois subgrupos: SAC13/SAC25, (perfil $\delta 1/\delta 2$ F) e SAC28/SAC29 (perfil $\delta 1/\delta 2$ C). A diferença entre o grupo de estirpes SAC13/SAC25 e SAC28/SAC29 centra-se somente na presença/ausência de uma banda de aproximadamente 2500 pb, que pode dever-se apenas a variações na concentração de DNA molde usado na reacção (Fernández-Espinar *et al.* 2001).

A diferenciação da estirpe comercial 771 das estirpes autóctones foi possível com todos os 'primers', excepto na análise visual dos perfis gerados pelos 'primers' $\delta 12/\delta 21$, embora só na amplificação com $\delta 1/\delta 2$ se tenha observado um perfil claramente distinto.

Nos pares de isolados SAC3/SAC4 e SAC18/SAC23 não foi possível diferenciar os isolados com nenhum dos métodos moleculares empregues (Tabela 3.1). Considerando as limitações destas técnicas uma abordagem interessante seria estudar a diferenciação dos isolados com técnicas com maior poder tipificante como a restrição do DNA mitocondrial, a cariotipagem ou a análise de microsatélites.

O recurso ao software Bionumerics® permite um maior nível de diferenciação que a simples observação dos perfis em gel. No entanto, a sua elevada sensibilidade pode ser uma desvantagem. Variações na coloração do gel, na qualidade da fotografia ou na normalização dos géis aquando da sua introdução no software, podem levar a variações cumulativas no resultado final que, por vezes, resultam numa maior diferenciação que a realmente existente. Tendo em conta que o coeficiente de Pearson é um coeficiente de diferenciação com capacidade de avaliação de caracteres quantitativos, a presença/ausência de bandas ténues adquire uma importância acrescida e é determinante não só na quantidade de perfis discriminados mas também nos valores dos índices de semelhança entre estes durante a construção de dendrogramas. Um dos exemplos da importância deste fenómeno está patente na Figura 3.5 onde se pode observar que para as estirpes SAC5 e SAC6, apresentando um perfil visualmente igual em termos de número e dimensão de bandas, a variação de intensidade das bandas geradas, quando analisada com um coeficiente de correlação quantitativo (coeficiente de Pearson), resulta num nível de semelhança de 81,3%, um valor não muito distante do índice de semelhança observado para as estirpes SAC 8 e SAC 20 (78,1%) que apresentam perfis claramente distintos.

Conclusões gerais e perspectivas futuras

O estudo de estirpes autóctones com vista à aplicação na indústria vinícola é uma tarefa árdua e infundável. Fica sempre a ideia que por mais estudos que sejam feitos, nunca são suficientes para permitir uma compreensão total do processo de vinificação e dos papéis dos seus intervenientes. Quanto mais se descobre, mais são as questões que surgem e, 8000 anos e inúmeros avanços tecnológicos depois, a criação de um vinho extraordinário continua a ser acima de tudo uma arte.

Neste trabalho pretendeu-se estudar uma colecção de 768 leveduras isoladas de mostos provenientes de quatro regiões Denominadas Origem Controlada fornecidos pela empresa Sogrape Vinhos S.A. durante o ano de 2007. O objectivo era encontrar nesta colecção uma ou mais leveduras particularmente adaptadas a fermentação de castas da Sogrape permitindo a criação de novos vinhos de elevada qualidade mantendo as características regionais típicas.

O trabalho foi dividido em 3 Fases distintas e sequenciais. As primeiras 2 Fases consistiram na aplicação de critérios de selecção de forma a gradualmente ir eliminando os isolados não desejados. Desta forma reduziu-se o número de potenciais estirpes 'starter' de 768 para 33. A Fase final consistiu no estudo comparativo de algumas técnicas de tipificação por "PCR-fingerprinting" na sua capacidade não só de diferenciar os isolados seleccionados como de gerar perfis suficientemente distintos que sirvam de marcadores moleculares de rastreio em estudos futuros.

Tendo em conta a avaliação da diversidade da colecção e à aplicação de métodos moleculares de 'MSP-PCR fingerprinting' (Fase I), ainda que esta abordagem permita uma rápida e fácil diferenciação dos isolados, uma mais cuidadosa identificação das características fenotípicas dos isolados durante o isolamento e a inclusão de um maior número de estirpes controlo de espécies não-*Saccharomyces*, permitiriam uma caracterização muito mais detalhada e uma redução maior da colecção nas fases iniciais, diminuindo o custo e o esforço associados.

Relativamente à Fase II, as microvinificações em microplaca são uma forma extremamente económica e rápida de estudar o potencial fermentativo de um número vasto de isolados. No entanto, o reduzido volume, tanto de mosto como de inóculo, obrigam a cuidados redobrados durante a inoculação. Ainda assim, ligeiras flutuações de inóculo, considerando o reduzido volume em que se encontram, podem resultar numa amplificação exagerada de respostas diferenciais conducentes a erros de selecção. A inclusão de mais réplicas pode ser a solução, diminuindo significativamente o erro sem aumentar exponencialmente o tempo.

A escolha do comprimento de onda de 520 nm pode ter contribuído também para algumas das flutuações de leituras observadas ao longo deste estudo e o uso de outros comprimentos de onda, mais apropriados para medição de luz dispersa por partículas (células) em suspensão (nomeadamente 600 nm) pode ser a resposta.

As inoculações individuais dos isolados permitem uma avaliação real do seu comportamento sem ter em conta efeitos de competição. Isto permite um estudo mais individualizado e compreensivo dos isolados e da variação das respostas de cada um a cada condição.

O estudo do crescimento das leveduras à temperatura de 8°C poderia ter beneficiado de um período mais alargado. Ainda que 127 horas tenham permitido diferenciar as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* das não-*Saccharomyces*, um estudo mais prolongado e a inclusão de um período de pré-adaptação poderiam ter resultado em maiores variações no comportamento dos isolados. Embora os

efeitos de inoculações a baixas temperaturas na retenção de aromas dos vinhos brancos tenham já sido amplamente documentados (Torijá et al. 2003; Coleman et al. 2007; Charoenchai et al. 1998; Sharf & Margalith 1983), o número de estudos de fermentações efectuadas abaixo dos 10°C é ainda reduzido. Uma maior incidência dos estudos nestas temperaturas e uma maior inclusão de espécies não-*Saccharomyces* (crescem melhor que *S. cerevisiae*) poderão abrir novos horizontes na produção moderna de vinhos.

Quanto à Fase III, as técnicas estudadas revelaram-se insuficientes para uma diferenciação completa dos isolados *S. cerevisiae* da colecção. Ainda assim, a sua facilidade e rapidez de aplicação são uma mais valia no controlo de fermentações inoculadas. O desenvolvimento de novos 'primers' e o estudo de outras condições de amplificação poderão aumentar a resolução destas técnicas.

Uma abordagem interessante seria comparar os resultados observados com os gerados por técnicas com maior poder tipificante como a restrição do DNA mitocondrial, cariotipagem ou a análise de dimensão de microsatélites (SSR).

Ainda que este estudo tenha restringido muito o número de isolados na colecção inicial no que toca ao seu potencial de aplicação como estirpes "starter", as leveduras seleccionadas estão ainda longe de poderem ser consideradas aptas. Uma série de estudos ficam ainda por fazer, entre os quais,

- Determinação das características organolépticas do produto final e análise sensorial;
- Resultados em fermentações em larga escala;
- Avaliação da consistência do produto final;
- Confirmação que estes isolados correspondem a estirpes autóctones naturais e não a estirpes comerciais que se possam ter fixado na região;
- Resistência a dessecação, conservação a longo prazo e criopreservação.

Acima de tudo este estudo vem reafirmar a importância da não restrição das espécies usadas para produção de vinhos a *Saccharomyces cerevisiae*. Ao assumir uma abordagem igualitária para todos os isolados foi possível avaliar o comportamento destes em cada condição e determinar o potencial individual de cada isolado sem ter em conta a espécie.. Desta forma, ainda que o grupo final de leveduras seja maioritariamente composto por estirpes *S. cerevisiae* foi possível a selecção de quatro isolados não-*Saccharomyces* que poderão vir a desempenhar um papel importante na produção de novos vinhos.

Bibliografia

- Alexandre, H, & Charpentier, C (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 20-27.
- Alves, A, Phillips, AJL, Henriques, I, & Correia, A (2007) Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in microbiology* 158: 112-21.
- Andorrà, I, Landi, S, Mas, A, Guillamón, JM, & Esteve-Zarzoso, B (2008) Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25: 849-56.
- Andrade, MJ, Rodríguez, M, Sánchez, B, Aranda, E, & Córdoba, JJ (2006) DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 48-58.
- Azenha, M, Vasconcelos, MT, & Moradas-Ferreira, P (2000) The influence of Cu concentration on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90: 163-7.
- Baleiras Couto, MM, Eijssma, B, Hofstra, H, Huis In't Veld, JHJ, & van Der Vossen, JMBM (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 41-46.
- Bauer, FF, & Pretorius, IS (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency- How to survive the making of wine - A Review. *S. Afr J. Enol. Vitic* 21: 27-51.
- Barnett, JA, Payne RW, & Yarrow D, (2000) Yeasts: Characteristics and identification (3rd ed). Cambridge University Press, New York USA.
- Beh, AL, Fleet, GH, Prakitchaiwattana C, & Heard, GM (2006), Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages p. 69–106, In: AD Hocking, JI Pitt, RA Samson, U Thrane (Eds.), *Advances in Food Mycology, Series: Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 571.
- Beltrani i Casellas, G (2005) Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism. Tese doutoramento, Universitat Rovira i Virgili, Italia.
- Benda, I (1982) Wine and Brandy, p. 293-402, In: G. Reed (Ed), Prescott & Dunn's Industrial Microbiology (4th ed), Avi Publishing Co.,Inc, Westport USA
- Berthels, NJ, Cordero Otero, RR, Bauer, FF, Thevelein, JM, & Pretorius, IS (2004) Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* 4: 683-9.
- Bisson, LF (1999) Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 107-119.
- Briones, AI, Ubeda, J, & Grando, MS (1996) Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 369-377.
- Capece, A, Romaniello, R, Siesto, G, Pietrafesa, R, Massari, C, Poeta, C, & Romano, P (2010) Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*
- Capece, A, Salzano, G, & Romano, P (2003) Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 33 - 39.
- Cappello, MS, Blevé, G, Grieco, F, Dellaglio, F, & Zacheo, G (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1274-80.
- Carreto, L, Eiriz, MF, Gomes, AC, Pereira, PM, Schuller, Dorit, & Santos, MAS (2008) Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics* 9: 1471-2164.
- Cavazza, A, Poznanski, E, & Trioli, G (2004) Restart of Fermentation of Simulated Stuck Wines by Direct Inoculation of Active Dry Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 160-167.

- Charoenchai, C, Fleet, GH, & Henschke, PA (1998) Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 283-288.
- Charpentier, Claudine, Colin, A, Alais, A, & Legras, J (2009) French Jura flor yeasts : genotype and technological diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 263-273.
- Clemente-Jimenez, JM, Mingorance-Cazorla, L, Martínez-Rodríguez, S, Las Heras-Vázquez, FJ, & Rodríguez-Vico, F (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21: 149-155.
- Coleman, MC, Fish, R, & Block, DE (2007) Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5875-84.
- Constantí, M, Reguant, C, Poblet, M, Zamora, F, Mas, A, & Guillamón, JM (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 169-75.
- Di Maro, E, Ercolini, D, & Coppola, S (2007) Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 201-10.
- Der Westhuizen, TJ van, Augustyn, OHP, & Pretorius, I.S. (2000) Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr J. Enol. Vitic* 21: 3-9.
- Esteve-Zarzoso, B, Gostincar, A, Bobet, R, Uruburu, F, & Querol, A (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the "El Penedès" area (Spain). *Food Microbiology* 17: 553-562.
- Estreicher, SK (2006) Wine. From the neolithic times to the 21st century. Algora Publishing, USA.
- Fernández-Espinar, M T, López, V, Ramón, D, Bartra, E, & Querol, A (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 1-10.
- Fleet, GH (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8: 979-995.
- Fleet, GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 11 - 22.
- Fleet, GH (2001) Wine, pp. 747-771 In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. MP Doyle et al. (Eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Fleet, GH, Lafon-Lafourcade, S, & Ribéreau-Gayon, P (1984) Evolution of yeasts and lactic Acid bacteria during fermentation and storage of bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1034-8.
- Foschino, R, Gallina, S, Andrighetto, C, Rossetti, L, & Galli, A (2004) Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research* 4: 609-18.
- Gaitanis, G et al. (2009) Malassezia furfur fingerprints as possible markers for human phylogeography. *The ISME journal* 3: 498-502.
- González Techera, A, Jubany, S, Carrau, FM, & Gaggero, C (2001) Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Letters in Applied Microbiology* 33: 71-5.
- Guillamón, JM, Sabaté, J, Barrio, E, Cano, J, & Querol, A (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol* 169: 387-92.
- Heard, GM, & Fleet, GH (1988) The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Microbiology* 65: 23-28.
- Heard, GM, & Fleet, GH (1985) Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 727-728. .
- Hohmann, S (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 300-72.

- Hunter, PR, & Gaston, MA (1988) Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Jackson, RS (2000) Wine Science Principles Practice Perception (2nd ed), Academic Press, California USA
- Kurtzman, CP (1998) Yeast Systematics - from Phenotype to Genotype. *Food Technol. biotechnol* 36: 261-266.
- Kurtzman, CP, & Robnett, CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Laitila, A, Wilhelmson, A, Kotaviita, E, Olkku, J, Home, S, & Juvonen, R (2006) Yeasts in an industrial malting ecosystem. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 33: 953-66.
- Lavallée, F, Salvas, Y, Lamy, S, Thomas, DY, Degrée, R, & Dulau, L. (1994) PCR and DNA Fingerprinting Used as Quality Control in the Production of Wine Yeast Strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 86-91.
- Legras, JL, & Karst, F (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* 221: 249-255.
- Lehmann, FL (1987) Secondary fermentations retarded by high levels of free sulfur dioxide. *Aust. N.Z. Wine Ind. J.* 2, 52-53.
- Lemsaddek, A (2008) Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. Tese doutoramento, Universidade de Lisboa, Portugal.
- Lieckfeldt, E, Meyer, W, & Börner, T (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology* 33: 413-25.
- Llauradó i Reverchon, JM (2002) Avaluació dels condicionants del most en el desenvolupament de la fermentació alcohòlica a baixes temperatures. Tese doutoramento, Universitat Rovira i Virgili, Itàlia.
- Lonvaud-Funel, A (2002) Starters for the Wine Industry, p. 31-47, in M. Hofman, J. Anné, V. Nedović, R. Willaert, A. Durieux, J.P Simon (Eds), *Applied Microbiology Focus on Biotechnology*, vol 2, Part 1, Springer, Netherlands
- Lopes, CA, Broock, M van, Querol, A, & Caballero, AC (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology* 93: 608-15.
- López, V, Querol, A, Ramón, D, & Fernández-Espinar, MT (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 75-81.
- Loureiro, V (2000) Spoilage yeasts in foods and beverages : characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International* 33.
- McGovern, PE (2009) *Uncorking the Past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*. University of California Press, Berkeley Los Angeles, USA.
- McGovern, PE (2003) *Ancient wine. The search for the origins of viticulture*. Princeton University Press, Princeton New Jersey, USA
- Meyer, W, Lieckfeldt, E, Kuhls, K, Freedman, E, Börner, T, & Mitchell, T (1993) DNA- and PCR-fingerprinting in fungi. *EXS.* 67: 311-20.
- Ness, F, Lavallée, F, Dubourdieu, D, Aigle, M, & Dulau, L (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62: 89-94.
- Pallmann, CL, Brown, JA, Olineka, TL, Cocolin, L, Mills, DA, & Bisson, LF (2001) Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 52: 198-203.
- Pramateftaki, PV, Lanaridis, P, & Typas, MA (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology* 89: 236-48.

- Pretorius, IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium : novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 2000 16: 675-729.
- Pretorius, IS & van Der Westhuizen, TJ (1991) Impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry. *S. Afr J. Enol. Vitic* 12: 3-32.
- Pérez, MA, Gallego, FJ, Martínez, I & Hidalgo, P (2001) Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology* 33: 461-6.
- Querol, A, Barrio, E, Huerta, T & Ramon, D (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2948-2953.
- Querol, A & Ramon, D (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 73-78.
- Rainieri, S & Pretorius, IS (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* 50: 15-31.
- Ribéreau-Gayon, P, Glories, Y, Maujean, A & Dubourdieu D (2006a) The Handbook of Enology: Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications (2nd ed.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex England
- Ribéreau-Gayon, P, Glories, Y, Maujean, A & Dubourdieu D (2006b) The Handbook of Enology: Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments (2nd ed.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex England
- Ribéreau-Gayon, P (1985) New Developments In Wine Microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 1-10.
- Ribéreau-Gayon, J, Peynaud, E, Ribéreau-Gayon, P, & Sudraud P (1975) Sciences et Techniques du Vin, vol 2: Caractères des vins, Maturation du raisin, Levures et bactéries. Dunod, Paris França.
- Romano, Patrizia, Capece, Angela, & Serafino, V (2008) Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1797-1802.
- Roz, N, Poblet, M, Guillam, M, & Mas, A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations : Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 345-352.
- Santos, J, Sousa, MJ, Cardoso, H, Inácio, J, Silva, S, Spencer-Martins, I, & Leão, C (2008) Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology* 154: 422-30.
- Sarais, I, Manzano, M, Bertoldi, MD, Romandini, P, Beltramini, M, Salvato, B, & Rocco, GP (1994) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* strain to high copper concentrations. *BioMetals* 7: 221-6.
- Scardovi, V (1951). Studi sulla resistenza all'anidride solforosa. Nota I - Annali di Microbiologia, 4, 131.9
- Schuller, D, Valero, E, Dequin, S, & Casal, M (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett* 231: 19-26.
- Schuller, D, Alves, H, Dequin, S, & Casal, M (2005) Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 167-177.
- da Silva-Filho, EA, Brito dos Santos, SK, Resende, ADM, de Moraes, JOF, de Moraes, MA, & Ardaillon Simões, D (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88: 13-23.
- Sneath, PHA., Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classifications, Freeman, San Francisco USA
- Soll, DR (2000) The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 332-370.
- Torija, MJ, Rozès, N, Poblet, Montse, Guillamón, José Manuel, & Mas, Albert (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 47-53.
- Torija, MJ (2002) Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tese doutoramento, Universitat Rovira i Virgili, Italia.

- Torriani, S, Zapparoli, G, & Suzzi, G (1999) Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine - Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 207-215.
- Versavaud, A, Courcoux, P, Roulland, C, Dulau, L, & Hallet, JN (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3521-9.
- Viegas, Jennifer. "Ancient Mashed Grapes Found in Greece." Archaeology Discovery News. March 16, 2007. Discovery Channel. Copyright © 2008 Discovery Communications http://dsc.discovery.com/news/2007/03/16/oldgrapes_arc.html?category=archaeology&guid=20070316120000
- Volleková, A, Malík, F, Vollek, V, & Lincényiová, K (1996) Characterization of yeasts isolated from red wine surface film. *Folia Microbiologica* 41: 347-52.

Anexos

Anexo 1 Número de espécies e géneros das 342 leveduras seleccionadas na Fase I, identificados por sequenciação da região D1/D2 do gene do rRNA 26S e análise de homologia com sequências disponíveis em bases de dados públicas por BLAST nucleotídico no site do ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI).

Género/ Espécie D1/D2	Nº isolados	Nº isolados por Género
<i>Candida apicola</i>	1	76
<i>Candida oleophila</i>	1	
<i>Candida</i> sp.	3	
<i>Candida stellata</i>	16	
<i>Candida stellata</i> ou <i>Candida zemplanina</i>	48	
<i>Candida zemplanina</i>	7	
<i>Cryptococcus saitoi</i>	0	1
<i>Hanseniaspora meyeri</i>	1	3
<i>Hanseniaspora vineae</i> ou <i>Hanseniaspora osmophila</i>	1	
<i>Hanseniaspora</i> sp.	1	
<i>Issatchenkia orientalis</i> (<i>Pichia kudriavzevii</i>)	5	5
<i>Lachancea</i> sp.	10	46
<i>Lachancea thermotolerans</i>	36	
<i>Metschnikowia fructicola</i>	12	158
<i>Metschnikowia</i> aff. <i>fructicola</i>	14	
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	3	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	9	
<i>Metschnikowia</i> sp.	120	
<i>Pichia fermentans</i>	1	9
<i>Pichia kluyveri</i>	4	
<i>Pichia</i> sp.	4	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31	31
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	1	1
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	6	10
<i>Torulaspora</i> sp.	4	
Não Identificados	2	